

최종  
연구보고서

생리학적 안전성 및 향미특성이 우수한 탈카페인  
녹차엽의 개발

Development of decaffeinated green tea with  
improved health-promoting and organoleptic  
properties

연구기관  
고려대학교

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “생리학적 안전성 및 향미특성이 우수한 탈카페인 녹차엽의 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 5 월 24 일

주관연구기관명 : 고려대학교  
총괄연구책임자: 김 경 현  
세부연구책임자 : 김 경 현  
연 구 원 : 박 형 석  
연 구 원 : 이 희 진  
세부연구책임자 : 이 광 원  
연 구 원 : 구 윤 창  
연 구 원 : 홍 충 의  
협동연구기관명 : 이화여자대학교  
협동연구책임자 : 김 영 석  
연 구 원 : 김 광 옥  
연 구 원 : 이 사 라  
연 구 원 : 조 인 희  
연 구 원 : 정 원 영  
연 구 원 : 이 소 민  
연 구 원 : 신 진 영

# 요 약 문

## 제 1세부

본 연구에서 녹차엽으로 부터 카페인을 제거하는 공정을 개발하기 위하여 이상적인 용매로 널리 알려진 초임계 이산화탄소와 함께 조용매로 에탄올과 물을 사용하였다. 추출조건의 최적화에 있어서 카페인의 변화량은 물론 녹차 내의 중요한 생리활성 성분인 EGCG, EGC, ECG, EC의 함량 변화도 중요하다. 이를 만족시키기 위해 추출 최적조건인 온도 70°C, 압력 300 bar, 그리고 조용매로 95% 에탄올을 이산화탄소 100g 당 7.0g의 비율로 추출했을 때, 녹차 내 카페인의 함량이 초기 함량 대비 2.6% 잔존하였으나 EGCG의 함량도 초기함량 대비 40% 정도 손실되는 결과를 얻었다. 카페인 추출 수율은 온도가 일정할 때 압력이 증가할수록 높고, 압력이 일정한 조건에서는 온도가 높아질 수록 수율이 높게 나타났다. 또한 이산화탄소의 유속을 증가 시켰을 때 카페인의 양적인 추출 수율은 증가 하였으나, 녹차입자의 외부물질전달 저항의 영향이 적기 때문에 이산화탄소 사용량에 대한 상대적 추출 수율은 감소 하였다. 녹차엽의 입자크기를 감소 시켰을 때는 녹차입자 내부의 물질전달 저항이 적어져서 카페인의 추출이 잘 되는 결과를 얻었다. 위의 물리화학적 및 물질전달적인 실험조건을 바탕으로 80-120 분간 추출하였을 때 카페인 90%이상 제거되고 카테킨 성분 중 가장 많은 함량을 차지하는 EGCG는 50% 가량 잔존하는 결과를 얻었다. 위의 실험조건을 scale-up 했을 때도 적용 할 수 있는지 알아 보기 위해 pilot-scale 에서 확인 해본 결과 비슷한 경향을 확인 할 수 있었다. 그렇지만 pilot-scale에서는 초임계 이산화탄소 사용량 대비 카페인의 추출 수율이 lab.-scale에 비해 현저하게 적게 나타나는 결과를 확인할 수 있었다. 이는 사용된 추출용기, 시료량 그리고 이산화탄소의 유속이 lab.-scale보다 굉장히 커서 수율이 낮은 결과를 나타내었다.

## 제 2세부

녹차에는 10~30%의 폴리페놀성분과 2~4%의 카페인이 함유되어 있다. 카페인을 질소를 함유하고 있는 알카로이드 화합물의 일종으로서 흥분, 초조함, 두통, 불면증, 저체중아 출산 등을 유발한다. 이러한 부작용으로 인하여 카페인 성분을 제거한 탈카페인 음료가 시장에 등장하였고 탈카페인 커피는 이미 1970년대부터 커다란 시장을 형성하고 있다. 녹차의 생리작용이 알려지기 시작하면서 커피의 높은 소비율은 점점 녹차로 이동하고 있다. 유기용매는 암을 유발하기 때문에 초임계이산화탄소를 이용한 탈카페인 방법이 산업화되었고 친환경적이며 향미성분의 유실이 적다는 장점을 가지고 있다. 초임계이산화탄소를 이용한 디카페인 녹차는 안전한 것으로 생각되나 충분한 연구가 이루어지지 않았다. 이에 본 연구진은 CHL 세포주를 이용하여 염색체 이상 시험을 진행하였다. 탈카페인 녹차 추출물 5000, 2000, 1000 µg/ml을 처리하고 음성대조군과 비교하였을 때 염색체 이상 정도에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다(P>0.05). S9 혼합물을 이용한 대사활성화 방법에서도 같은 결과가 관찰되었다. 결론적으로 초임계이산화탄소를 이용한 탈카페인 녹차의 열수추출물은 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 나타났다.

## 제 3세부:

일반적인 녹차와 카페인이 제거된 녹차의 휘발성 향기성분을 비교하기 위해 동시증류추출법

(simultaneous steam distillation and solvent extraction, SDE)을 사용하여 추출하고, gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)로 분석하였다. 일반적인 녹차와 카페인이 제거된 녹차의 휘발성 향기성분으로 총 41개의 성분들이 동정 되었으며, 이는 8개의 alcohols, 15개의 terpene계 성분, 10개의 carbonyls, 4개의 질소 함유 성분, 4개의 기타 성분으로 분류되었다. 그 중에서 linalool과 phenylacetaldehyde는 일반적인 녹차와 카페인이 제거된 녹차에서 모두 많은 양이 정량되었다. 일반적인 녹차의 휘발성 향기 성분에 비해 초임계 이산화탄소를 사용하여 카페인을 제거한 녹차의 휘발성 향기성분은 대부분 감소하였으며, 카페인을 제거하면 할수록 보다 많은 휘발성 향기 성분이 감소하였다. 특히, 비극성 성분인 terpene계 성분의 경우 카페인을 제거하는 과정이 진행 될수록 휘발성 향기 성분은 점차적으로 감소하였다. 일반적인 녹차와 카페인이 제거된 녹차의 휘발성 향기활성성분은 단계별 희석한 향추출희석법 (aroma extract dilution analysis, AEDA)에 의해 동정, 비교되었다. 대부분의 greenish 하고 꽃향을 나타내는 hexanal, (E)-2-hexenal, 일부 미동정된 향기성분들은 카페인을 제거하는 과정 후에 손실 되거나 감소하였다.

## SUMMARY

**Part I :** In this study, to remove caffeine from green tea leaves (*Camellia sinensis*), we have employed supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>), which is known to be an ideal solvent, coupled with a cosolvent such as ethanol or water. In the optimization of the extraction conditions, not only variations in the amount of caffeine, but also the quantities of the principal bioactive components of green tea, including catechins such as epigallocatechin gallate (EGCG), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG), and epicatechin (EC), were determined. At optimal extraction conditions, including temperature, pressure, and cosolvent, the caffeine content in the decaffeinated green tea was reduced to 2.6% of initial content after extraction with SC-CO<sub>2</sub> modified with 95% (v/v) ethanol 7.0 g per 100 g of CO<sub>2</sub> at 300 bar and 70°C for 120 min. However, after extraction, a substantial loss of EGCG, as much as 40% of original content, proved unavoidable. The removal yield of caffeine increased with an increase in temperature at a constant pressure, and also at different pressures at a fixed temperature. When the CO<sub>2</sub> mass flow rate increased, the total extraction yield of caffeine (amount of caffeine extracted per amount of CO<sub>2</sub> used) also increased, but the extraction efficiency of CO<sub>2</sub> decreased, possibly due to the negligible effect of external mass transfer resistance around green tea leaf particles. The reduction of green tea leaf particle size by grinding also resulted in the enhanced extraction of caffeine through the predominance of intraparticle mass transfer resistance inside green tea particles. All together, over 90% of caffeine was removed, and 50% of EGCG was retained in the laboratory-scale (extraction vessel of 100-mL internal volume) extraction in 80-120 min. In the pilot-scale extraction (extraction vessel of 12-L internal volume), more than 90% of caffeine was removed, and 50% of EGCG was successfully was retained in the decaffeinated green tea leaves using SC-CO<sub>2</sub> extraction. However, the extraction yield of caffeine per kg of CO<sub>2</sub> used at the pilot scale was much lower that at the laboratory scale.

**Part II:** There are 10~30% polyphenol and 2~4% caffeine in green tea. Caffeine is a kind of alkaloid containing nitrogen which cause stimulation, impatience, headache, insomnia, low birth weight infant. Because of these negative effect, decaffeinated beverage came out and decaffeinated coffee already have a big market since 1970s. Having proving the physiologic functions of green tea, high consumption of coffee is shifting to green tea. Because of the carcinogenic effect of the organic solvents, decaffeine processing with supercritical carbon dioxide has industrialized and have an advantage in environment-friendly and minimized flavor loss. Decaffeinated green tea using supercritical carbon dioxide is considered to be safe but there are not enough study. We investigated the chromosome aberration test with mammalian cell line, CHL. When the cells were treated with 5000, 2000, 1000  $\mu\text{g/ml}$  and compared with the negative controls, there were no significant( $P>0.05$ ) increased chromosome aberration. Same results was observed when adding S9 mixture or not. As a result, water extract of decaffeinated green tea using supercritical carbon dioxide does not induce chromosome aberration.

**Part III:** Volatile components in regular and decaffeinated green teas were isolated by simultaneous steam distillation and solvent extraction (SDE), and then analyzed by GC-MS. A total of 41 compounds, including 8 alcohols, 15 terpene-type compounds, 10 carbonyls, 4 N-containing compounds and 4 miscellaneous compounds, were found in regular and decaffeinated green teas. Among them, linalool and phenylacetaldehyde were quantitatively dominant in both regular and decaffeinated green teas. By decaffeination process using supercritical carbon dioxide, most volatile components decreased. The more caffeine was removed, the more volatile components were reduced in green teas. In particular, relatively non-polar compounds such as terpene-type compounds gradually decreased according to the decaffeination process. Aroma-active compounds in regular and decaffeinated green teas were also determined and compared by aroma extract dilution analysis (AEDA). Most greenish and floral flavor compounds such as hexanal, (E)-2-hexenal and some unknowns disappeared or decreased after the decaffeination process.

# Contents

<b>Chapter 1. Introduction.....</b>	<b>9</b>
Section 1. Objectives of the Research.....	10
Section 2. Needs of the Research.....	10
Section 3. Contents of the Research.....	13
<b>Chapter 2. Current States of Research and Development.....</b>	<b>18</b>
Section 1. Decaffeination in Food Industry.....	19
Section 2. Safety of Solvents used in Food Industry.....	19
Section 3. Research in Toxicity of Caffeine.....	19
Section 4. Research in Orgaoleptic Peoperties of Green Tea.....	20
<b>Chapter 3. Contents and Results of the Research.....</b>	<b>21</b>
Section 1. Selectivity of Caffeine and Catechins in Various Solvents.....	22
Section 2. Development of Decaffeination Process for Green Tea.....	37
Section 3. Decaffeination Process for Green Tea by Ethyl acetate.....	56
Section 4. Market Trend and Process Economics for Decaffeinated Green Tea.....	63
Section 5. Safety Assessment of Green Tea.....	68
Section 6. Safety and Functional Assessment of Green Tea Decaffeinated by SC-CO <sub>2</sub> ....	78
Section 7. In vivo Functional Assessment of Green Tea.....	106
Section 8. Extraction and Analytical Methods of Volatiles from Green Tea.....	125
Section 9. Volatile Flavor Compounds from Green Tea Decaffeinated by SC-CO <sub>2</sub> .....	135
Section 10. Volatile Flavor Compounds from Green Tea Decaffeinated by Ethyl Acetate.....	142
Section 11. Sensory Evaluation of Green Tea Decaffeinated by SC-CO <sub>2</sub> .....	149
Section 12. Consumer Evaluation of Green Tea Decaffeinated by SC-CO <sub>2</sub> .....	157
Section 13. Sensory Evaluation of Green Tea Decaffeinated by Ethyl Acetate.....	164

<b>Chapter 4. Goal Achievement and Contribution to Related Industries.....</b>	<b>169</b>
Section 1. Achievements of goals.....	170
Section 2. Expected contributions to related industries.....	171
<b>Chapter 5. Application Plan of the Results.....</b>	<b>173</b>
Section 1. Industrial Application of Research Results.....	174
Section 2. Further Study.....	175
<b>Chapter 6. New Technologies from Abroad.....</b>	<b>176</b>
<b>Chapter 7. References.....</b>	<b>178</b>

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	9
제 1 절	연구개발의 목적.....	10
제 2 절	연구개발의 필요성.....	10
제 3 절	연구개발의 범위.....	13
제 2 장	국내외 기술개발 현황.....	18
제 1 절	식품산업에서의 탈카페인 기술.....	19
제 2 절	식품용 추출용매의 안전성.....	19
제 3 절	카페인 생리학 독성 관련 연구동향.....	19
제 4 절	녹차의 향미 특성 및 관능 특성 연구 동향.....	20
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....	21
제 1 절	카페인과 catechin의 추출용매 별 선택적 분리조건 최적화.....	22
제 2 절	녹차엽의 탈카페인 공정의 개발.....	37
제 3 절	Ethyl acetate를 이용한 녹차엽의 선택적 탈카페인 추출조건 확립.....	56
제 4 절	녹차시장 현황 및 탈카페인의 시장현황 조사 분석과 탈카페인 제거 공정의 경 제성 평가.....	63
제 5 절	녹차엽의 생리적 안전성 평가.....	68
제 6 절	초임계이산화탄소에 의해 탈카페인된 녹차엽의 in vitro 안전성 및 기능성 평가.....	78
제 7 절	생산소재의 in vivo 기능성 효능 연구.....	106
제 8 절	녹차엽의 휘발성 향미성분의 추출법 및 분석법 확립.....	125
제 9 절	초임계 이산화탄소에 의해 탈카페인된 녹차엽의 휘발성 향미성분 분석.....	135
제 10 절	Ethyl acetate에 의해 탈카페인된 녹차엽의 휘발성 향미성분 분석 및 향기활 성성분 분석.....	142
제 11 절	초임계 이산화탄소에 의해 탈카페인된 녹차엽의 관능검사.....	149
제 12 절	초임계 이산화탄소에 의해 탈카페인된 녹차엽의 소비자 기호도 검사.....	157
제 13 절	Ethyl acetate에 의해 탈카페인된 녹차엽의 관능검사.....	164



제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	169
제 1 절	연구개발 착안점 및 달성도.....	170
제 2 절	관련분야의 기술발전에의 기여도.....	171
제 5 장	연구개발결과의 활용계획.....	173
제 1 절	연구 활용 방안.....	174
제 2 절	추가 연구의 필요성.....	175
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	176
제 7 장	참고문헌.....	178

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

- 다양하고 우수한 생리활성을 갖는 녹차로부터 특정인들에게 여러 가지 부작용을 일으킬 수 있는 카페인을 제거함으로써 카페인 부작용이 있는 사람들을 위한 탈카페인 녹차를 제품화한다.
- 국내외 녹차제품의 차별화와 소비량 증가시켜 녹차 생산 농가의 수입증대에 도움이 된다.
- 2005년 이후 녹차의 수입관세가 현저히 낮아지게 되면 녹차 수입이 급격히 증가될 것으로 예상되지만, 수입된 녹차엽을 가공하여 탈카페인 녹차제품을 역수출하여 외화획득에 기여한다.
- 탈카페인이 가져올 녹차의 생리학 및 독성학적 효과의 변화를 과학적으로 구명하여 기능성 소재로서의 탈카페인 녹차 생산의 학문 및 산업적 활용기반을 한 단계 심화시킨다..
- 환경친화적 식품공정의 개발로 국내 식품가공산업의 기술 혁신에 이바지한다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

#### ○ 탈카페인 녹차엽의 생리활성 효과

- 녹차엽에는 건체 중량기준 10-30%의 polyphenol 성분과 2-4%의 카페인이 함유되어 있다.
- 카페인(trimethylxanthine)은 커피, 차, 구아나라, 카카오 등의 식물에 존재하는 질소함유 알칼로이드의 한 종류로서 중추신경, 심장, 혈관, 신장 등을 자극하는 효과를 가지고 있다.
- 카페인은 위와 같은 긍정적인 효과와 더불어 자극, 흥분, 초조, 두통, 불면, 산모의 저체중아 출산 등의 부정적인 효과로 인해 그 섭취를 제한하고자 탈카페인 음료제품이 등장하였다.
- 녹차와 녹차에 함유된 폴리페놀 단일성분에 의한 여러 가지 생리활성에 대한 연구는 많이 되고 있으나, 녹차에 다량 존재하는 폴리페놀과 카페인의 생리학적 상호작용에 대해서는 연구가 전무한 실정이다(정동효, 김종태).
- 본 연구진은 카페인이 녹차의 생리활성 주요성분인 catechin과 같이 존재 시에는 allyl alcohol에 의한 세포독성 및 peroxide의 생성이 증가하고, 카페인을 제거 시에는 이러한 카페인에 의한 부정적 효과가 유의적으로 감소함을 예비실험에서 확인하였다.

#### ○ 탈카페인 녹차의 향미특성 및 관능특성 고찰

- 녹차 소비의 주된 이유는 녹차의 생리활성 효과와 기호도와 관계가 있는 녹차의 향미특성이다.
- 탈카페인 제조과정 시 녹차엽 내 일부 향미 성분의 변화가 예상된다. 따라서, 녹차엽 향미 성분의 효율적인 정성, 정량적 분석법 확립과 이를 이용한 탈카페인 녹차엽 추출공정에 따른 향미 성분 손실과 변화에 대한 고찰이 요구된다.
- 기존 녹차엽과 탈카페인된 녹차엽의 관능적 특성을 비교하며, 향미 성분 분석 결과와의 상호관계성을 밝혀 탈카페인 녹차의 향미 특성 및 관능적 특성을 높일 필요성이 있다.

## ○ 녹차엽의 탈카페인기술 현황

- 서구에서 오래전부터 trichloroethylene, dichloromethane 등의 유기용매를 이용한 커피의 탈카페인공정이 산업적으로 이용되어 왔다.
- 그러나 이들 유기용매의 발암성이 밝혀짐에 따라 ethyl acetate나 초임계이산화탄소를 이용한 방법이 산업화되었으며, 특히 초임계이산화탄소를 이용한 탈카페인공정은 환경친화성, 향기성분의 손실 최소화 등의 장점으로 점차 이용도가 증가하고 있다.
- 녹차엽의 탈카페인공정개발에 대한 연구사례는 아직 논문이나 특허로 보고된 바가 없다.

## ○ 국내 농산가공산업의 첨단기술개발에 이바지

- 초임계이산화탄소는 최근 들어 제약, 향수, 생명공학, 정밀화학, 반도체 등 여러 고부가가치산업에 이용되기 시작한 첨단기술이다.
- 여러 가지 장점이 있음에도 불구하고, 식품 및 농산가공산업에서는 실제 공정화단계에서의 연구부족과 경제성문제로 산업화가 된 예가 드문 현실이다.
- 따라서 식품 및 농산가공산업에서의 청정공정개발의 선두자적 성공적 사례가 될 수 있다.

## 2. 경제·산업적 측면

### ○ 국내 녹차시장의 현황과 농가소득 증대효과

- 국내 녹차 재배면적은 2001년에 1,830ha이며, 전국 차 생산량은 1,394.5톤임(농림부, 2001년도 특용작물 재배실적).
- 2003년 국내 녹차시장은 1153억원대로서 99년 이후 매년 4~13%씩 성장됨(시장조사업체 AC Nielsen; 김종태, 2000). 이는 보리차와 홍차 등 다른 차류시장이 정체되거나 마이너스 성장을 기록하는 것과 대조된다.
- 수년전 10g에 그치던 우리나라 국민 1인당 녹차소비량은 2000년 기준 38g 정도 (FAO 자료)에 이르렀고, 수요가 공급을 초과하였다. 그러나, 아직까지도 아일랜드 홍차의 1/104, 일본 녹차의 1/28, 중국 녹차의 1/10에 불과한 소비량을 나타내고 있어 향후 잠재시장의 성장에 대한 전망은 매우 밝다(박문호, 2003).
- 탈카페인녹차의 여러가지 긍정적 생리활성 효과를 과학적으로 구명함으로써 국내외 시장에서의 제품의 차별화와 소비량을 증가를 통하여 녹차생산 농가의 수입증대에 이바지 할 수 있다.
- 2005년 이후 녹차의 수입관세가 낮아지게 되면 녹차 수입이 증가될 것으로 예상되기 때문에 (김영걸 2003) 이에 대비한 특화된 국내 녹차가공기술력의 확보차원에서 유리한 고지 선점할 수 있다.

### ○ 세계의 녹차 생산, 소비 및 국가간 경쟁력 동향

- 중국이 연간 422천 톤으로 전체 생산량의 71%를 차지하는 세계 최대 녹차 생산국이고, 다음이 일본 88.7천 톤, 인도네시아 30천 톤, 베트남 29.6천 톤, 인도 8.3천 톤의 녹차를 생산 중

이다(김종태, 2000).

- 녹차의 생리활성에 관한 연구가 활발히 진행함에 따라 미국이나 유럽지역에서도 녹차의 소비가 급격히 증가추세를 보이고 있고, 기존의 영연방 국가나 회교국가 중심에서 커피를 주로 마시는 국가로 소비가 확대되는 실정이다(김종태, 2000).
- 중국과는 가격경쟁력, 일본에 비하여는 가격·품질경쟁력 면에서 열위에 있음. 더구나 주요 차 생산국인 중국과 대만의 WTO가입과 현재 협상중인 WTO/DDA농업협상에서 상당한 관세 이하가 합의될 경우, 고관세 장벽 보호를 받고 있는 국내녹차산업은 크게 불리한 입장에 처하게 되므로 이에 대한 대비책 마련이 절실하다(박문호, 2003).

#### ○ 국산 녹차의 세계 음료시장 진출을 위한 품질의 고급화

- 녹차의 여러 가지 우수한 생리활성효과가 과학적으로 증명이 되고 있고, 외국에서는 탈카페인 커피가 제품화가 성공적으로 이루어진 것으로 보아 탈카페인 녹차를 고급화된 녹차제품으로서 외국시장에서 제품으로서 성공할 가능성이 높다.
- 최근에는 카페인의 합성이 저해된 유전자조작 무카페인 커피나무가 개발 중일 정도로 카페인 제거 음료에 대한 소비자의 욕구가 높으나, GMO로서의 문제점과 장기간이 소요되는 커피나무재배 과정상의 어려움 등이 제기되고 있다.

#### ○ 탈카페인녹차와 여성소비자의 중요성

- 최근 중국의 WTO 가입이 가시화되고 한·중 무역 역조에 따른 농산물 시장 개방 요구의 증가와 더불어 전세계적으로 무관세 무역이 추진되고 있고, 녹차의 관세장벽이 무너질 것으로 예상됨에 따라 외국 제품과의 무한경쟁에서, 제품의 가격 및 품질의 경쟁력을 갖추는 것과 함께 한국 소비자 취향에 맞는 녹차 제품의 개발이 중요하다(김종태, 2000; 김영걸, 2001).
- 녹차는 건강과 미용에 효능이 있다는 사실이 널리 알려지면서 여성들이 많이 찾고 있으므로 천연적인 방법으로 제조된 탈카페인 녹차는 임산부 등 여성을 위한 특화된 제품으로서 시장성이 밝다.

#### ○ 분리된 카페인성분의 산업적 이용

- 중요한 정밀화학 및 의약품 성분으로도 이용되는 카페인을 차의 부산물이나 theophylline 및 theobromine으로부터 합성된다.
- 따라서 탈카페인공정에서 분리된 천연카페인 성분은 제약산업 및 식품산업에서 유용한 고가의 천연성분이므로 별도로 제품화가 가능하고 실제로 미국의 Maxwell House의 탈카페인공정에서 분리되는 카페인 성분은 이 공정의 주요한 이윤창출 요소이며 공정의 경제성을 높이는데 크게 기여하고 있다.

#### ○ 기능성 건강식품시장 개방화에 따른 기술적 대비

- 국내에서 유통되고 있는 건강보조식품 및 그 기능성 소재의 58%이상이 수입제품으로, 국내 자체 기술력 향상이 절실한 실정이다.
- 기능성 건강식품에 관한 법률이 공포 후 외국기업들의 국내시장 진출이 급속히 확대되고 있다.
- 따라서 현재 연구개발 및 기술력이 외국기업에 비해 뒤쳐져 있는 국내관련 산업의 기술력향

상을 위해, 첨단 식품공정을 통한 신제품의 개발은 국내 관련 업계에 긍정적인 효과를 줄 것이다.

○ 친환경적 식품산업공정의 개발

- 환경오염문제의 대두로 인하여 유독성 유기용매의 사용을 지양하고 친환경적이고 재회수가 용이한 초임계 이산화탄소를 이용한 새로운 청정식품공정의 개발은 관련 산업전반에 파급효과가 클 것이다.

### 3. 사회·문화적 측면

○ 카페인 고함유식품인 녹차의 식품 안전성 확보

- 커피, 홍차에 다량 함유된 카페인에 대한 우려 때문에 녹차에도 많이 존재하는 카페인에 대한 소비자의 부정적 인식과 잠재적 우려를 바꿀 수 있을 것으로 사료된다.
- 유아와 어린이의 카페인 해독속도는 성인에 비해 현저히 느리므로, 카페인에 어린이, 임산부, 노약자에게 해로운 영향을 끼치며 태아기의 모든 형성 단계에서 기형도 카페인에 의한 것일 수 있고(Nawrot, P. et al., 2003), 특히 어린이의 경우 카페인을 많이 섭취하게 되면 학습능력에 악영향을 미칠 수 있고, 임산부가 카페인이 함유된 식품을 과다 섭취하면 저체중 아이를 출산할 가능성이 높다.
- 따라서 어린이, 임산부, 노약자 등은 카페인의 섭취량을 제한할 필요가 있다.

○ 무공해성 초임계이산화탄소를 이용하여 생산된 제품에 대한 소비자의 인식

- 국민의 생활수준 향상으로 식품에 있어서도 천연, 무공해성 제품에 대한 소비자의 인식이 높다.
- 그러므로 독성이 있는 유기용매를 쓰지 않고 ethyl acetate나 이산화탄소를 이용해서 생산된 탈카페인 녹차엽을 이용한 제품에 대한 소비자의 선호도가 높을 것이다.

## 제 3 절 연구개발의 범위

### 1. 녹차엽의 탈카페인공정의 개발

가. 카페인과 catechin의 선택적 분리조건 최적화

- 카페인의 초임계 이산화탄소에서의 평형용해도를 온도, 압력, 공동용매로서의 물의 물분율을 달리하여 측정하였다.
- Catechin의 초임계 이산화탄소에서 평형용해도를 온도, 압력, 공동용매로서의 물의 물분율을 달리하여 측정하였다.

- 실제로 추출실험에 사용할 녹차엽에서의 카페인과 catechin의 함량비를 분석하여 같은 비율의 카페인-catechin 용질의 모델시스템을 만들어 초임계 이산화탄소에서 평형용해도를 온도, 압력, 공동용매로서의 물의 물분율을 달리하여 측정하여 선택적 분리도를 결정하였다.
- 카페인의 ethyl acetate 수용액에서의 평형용해도를 온도, 공동용매로서의 물의 물분율을 달리하여 측정하였다.
- Catechin의 ethyl acetate 수용액에서의 평형용해도를 온도, 공동용매로서의 물의 물분율을 달리하여 측정하였다.
- 실제로 추출실험에 사용할 녹차엽에서의 카페인과 catechin의 함량비를 분석하여 같은 비율의 카페인-catechin 용질의 모델시스템을 만들어 ethyl acetate에서 평형용해도를 온도, 압력, 공동용매로서의 물의 물분율을 달리하여 측정하여 선택적 분리도를 결정하였다.

#### 나. 초임계 이산화탄소이용 녹차엽의 선택적 탈카페인 추출조건 확립

- 카페인-catechin 용질의 모델시스템으로부터 결정된 최적분리조건을 바탕으로, 초임계 이산화탄소를 이용하여 실제 녹차엽으로부터 카페인의 선택적 추출실험을 실시하였다.
- 녹차엽 시료의 크기, 이산화탄소의 유속, 공동용매의 영향 등의 공정변수를 달리하여 추출속도에 미치는 영향을 분석하였다.
- 위에서 얻어진 자료를 바탕으로 최대의 카페인 추출, 최소의 catechin추출을 이룰수 있는 최적 조건을 확립하였다.

#### 다. Ethyl acetate이용 녹차엽의 선택적 탈카페인 추출조건 확립

- 카페인-catechin 용질의 모델시스템으로부터 결정된 최적분리조건을 바탕으로, ethyl acetate를 이용하여 실제 녹차엽으로부터 카페인의 선택적 추출실험을 실시하였다.
- 녹차엽 시료의 크기, ethyl acetate의 유속, 공동용매의 영향 등의 공정변수를 달리하여 추출속도에 미치는 영향을 분석하였다.
- Ethyl acetate에 의한 녹차엽의 엽록소 공동 추출량을 분석 정량하였다.
- 위에서 얻어진 자료를 바탕으로 ethyl acetate를 이용한 최대의 카페인 추출, 최소의 catechin추출을 이룰수 있는 최적 조건을 확립하였다.

#### 라. 녹차엽 탈카페인공정의 효율성 및 경제성 극대화

- 추출용매별 탈카페인 공정의 효율성과 경제성을 평가 및 비교하여 최적의 탈카페인공정을 선정 및 확립하였다.
- 탈카페인 제거공정의 scale-up 가능성 평가하여 공장화 방안을 모색하였다.

## 2. 탈카페인 녹차엽의 생리활성 및 안전성 평가

#### 가. 카페인 및 녹차 추출물 대표 성분 catechin의 bioactivation (phase I)의 차이 평가

- *In vitro* 일차 간세포 배양을 통한 카페인 및 catechin의 카페인의 biotransformation 대사속도

에 미치는 영향을 확인 하였다

- CYP1A 효소 활성 측정: CYP1A1 (EROD), CYP1A2 (MROD; methoxyresorufin O-deethylase 활성을 측정 하였다.
- CYP1A의 m-RNA transcriptional activity 측정, immunoblot assay를 측정 하였다.

나. 탈카페인공정별 카페인 제거 녹차엽 추출물의 기능성 검정

- 카페인 유도 간독성 억제 효능검색: Primary hepatocyte culture에서 allyl alcohol (an  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated alcohol)과 caffeine로 인한 hepatotoxicity 평가(cell viability, lipid peroxidation, sulfhydryl contents 측정) / Primary hepatocyte culture에서 acetaminophen과 caffeine으로 인한 hepatotoxicity 평가(CYP3A23, CYP3A2 mRNA 측정,  $^{14}\text{C}$ 를 이용한 단백질 합성 측정)

다. 획득 분획 유형별 기능성 검정

- 확립된 기능성 검정을 활용하여, 맞춤형 분리공정을 통해 확보된 소재의 기능성을 평가하였다
- Radical scavenging activity 평가: Ferric reducing/antioxidant power activity, DPPH radical scavenging activity
- $\text{Fe}_2^+$ /ascorbate 유도 microsomes의 지질과산화 억제 활성을 평가 하였다.
- Cell culture system을 이용한 세포 독성 억제와 항산화를 평가하였다.
- 개발소재의 세포내 oxidative DNA damage를 분석하였다.

라. 획득 분획 유형별 및 생산 소재의 항돌연변이성 검색

- 카페인 제거 녹차 추출물의 변이원성 및 돌연변이 예방 효능 검증: Salmonella microsome test: TA 98 (fragment shift), TA 100 (base-pair substitution) strains 이용한 standard plate incorporation assay를 평가하였다

마. 생산 소재의 암예방 기능성 검정

- *In vivo* 간독성에 대한 방어기능 활성 연구: Male S.D. rats (220 $\pm$ 10 g)에 대한 소재 추출물 (i.p.) injections 5회 (5days)/t-butylhydroperoxide (0.1 mmol/kg) (i.p.) injection 1회 투여 후, 간기능 표식자 ALT/AST 활성 평가 / 간 조직병리학적 병소억제 평가; 간조직의 GSH/GSSG 변화를 평가하였다.
- *In vivo* 항암성 효능 연구: 간암모델; Solt-Faber protocol에 따른 male S.D. rats (3주령), initiator diethylnitrosamin (i.p.) injections 2회, promoter 0.05% phenobarbital 음용시켜 간암 발생유도 후, 소재 추출물 (i.p.) injections 매주 2회, 9주간 투여한 후, GST-P(+) foci를 ABC법으로 면역화적 항암성 판정 / 피부종양(암)모델; DMBA, initiator (topical) injection 후, tetradecanoylphorbol acetate, promoter(topical)으로 피부종양(암) 유도 후, papillomas incidence(%), papillomas/mice로 항암성 판정

바. 생산 소재의 콜레스테롤 저하 기능성 검정



- *In vivo* 카페인 제거 녹차 추출물의 콜레스테롤 저하능 연구: Male Zucker rats (160-165 g) with high fat diet (50% sucrose containing 15% butter): total cholesterol, lipid and triglyceride in plasma and liver/Male Wistar rats (160-170 g) with high cholesterol diet (1% cholesterol and 10% coconut oil)- LDL peroxidation 측정, serum antioxidative activity, serum and liver LDL- and HDL-cholesterol levels 측정,  $AI = (\text{total cholesterol} - \text{HDL cholesterol}) / \text{HDL cholesterol}$ 을 측정하였다.

### 3. 탈카페인 녹차엽의 향기특성분석 및 관능평가

#### 가. 천연 녹차엽의 휘발성 향미 성분 및 향기활성성분 분석

- 동시용매증류추출, Static Headspace 추출, 고진공승화(High Vacuum Sublimation) 추출, Solid Phase Microextraction 등을 이용하여 녹차에서 추출되는 휘발성분을 정성 및 정량적으로 비교 분석하며, 이를 통해 최적 추출 조건 및 분석 조건을 확립하였다.
- 향추출희석분석법(Aroma Extract Dilution Analysis)을 이용하여 천연 녹차엽 내 향기활성성분을 동정하고 선정하였다.
- GC/FID, GC/MS, 내부표준물질 등을 이용하여 녹차엽 휘발성 향미 성분의 정량법을 확립하였다.
- 확립된 추출법 및 분석법을 이용하여 천연 녹차엽의 향미 특성을 분석하였다.

#### 나. 초임계 이산화탄소를 이용한 탈카페인 녹차엽의 휘발성 향미성분 및 향기활성성분 분석

- 동시용매증류추출, Static Headspace추출, 고진공승화추출, Solid Phase Microextraction 등을 이용하여 초임계 이산화탄소 탈카페인 녹차엽에서 추출되는 휘발성분을 정성 및 정량적으로 비교 분석하며, 이를 통해 최적 추출 조건 및 분석 조건을 확립하였다.
- 향추출희석분석법을 이용하여 탈카페인 녹차엽내 향기활성성분을 동정하고 선정하였다.
- GC/FID, GC/MS, 내부표준물질 등을 이용하여 탈카페인 녹차엽 휘발성 향미성분의 정량법을 확립하였다.
- 이를 토대로 천연녹차와 초임계 이산화탄소를 이용한 탈카페인 녹차엽의 휘발성 향미성분 및 향기활성성분 차이점을 정성 및 정량적으로 비교 분석하며, 초임계 이산화탄소 추출에 의한 휘발성 향미성분의 손실과 변화를 규명하였다.

#### 다. 초임계 ethyl acetate 이용 탈카페인 녹차엽의 휘발성 향미성분 및 향기활성성분 분석

- 1차년도 및 2차년도에 확립된 추출법 및 분석법을 이용하여 천연녹차와 초임계 ethyl acetate를 이용한 탈카페인 녹차엽의 휘발성 향미성분 및 향기활성성분 차이점을 정성 및 정량적으로 비교 분석하며, 초임계 ethyl acetate 추출에 의한 휘발성 향미성분의 손실과 변화를 규명하였다.
- 또한, 기기분석 결과와 위탁과제에서 얻어진 관능검사 결과와의 상관 관계를 규명하였다.
- 이를 통해 제품의 효율적인 평가법을 확립하였다.

#### 라. 초임계 이산화탄소이용 탈카페인 녹차엽의 관능적 특성 및 기호도 조사

- 묘사분석을 위하여 관능검사에 경험이나 관심이 있는 대학생 및 대학원생 8~10명 선정하여 시료와 평가 방법 및 평가 특성에 익숙해지도록 훈련하였다.
- 묘사분석 시 사용할 표준물질로 볶은 차 (볶은 차 향미), 마른 지푸라기 (지푸라기 향미), 삶은 밤 껍질 (밤껍질 향미), 탄 나뭇잎 (마른 잎 탄 내), caffein solution (쓴맛), Aluminum sulfate solution (뚱은 감각) 등과 같은 물질을 포함하였다.
- 녹차 시료의 준비, 제시 방법 및 맛보는 절차를 확립하기 위해 카페인이 제거되지 않은 대조구 녹차엽과 탈카페인 녹차엽의 우리는 물의 온도, 우리는 시간, 시료의 제시 온도, 온도 유지 방법, 제시할 시료의 양, 맛보는 시료의 양 및 맛보는 방법을 확립하였다.
- 관능검사 수행절차를 확립하기 위해 개인용 검사대에서 색이 미치는 영향을 배제하기 위해 조명을 조절하여 수행하고, 시료 평가 시간 간격을 조절하였다.
- 확립된 검사절차에 따라 묘사분석 수행하였다.
- 시료의 관능적 특성 강도 평가 결과에 대해 분산분석을 하여 시료의 관능적 특성 강도를 규명하고, 주성분 분석을 통해 공정에 따른 녹차의 향미 특성 변화를 이해하였다.

#### 마. Ethyl acetate이용 탈카페인 녹차엽의 관능적 특성 및 소비자 기호도 조사

- 확립된 묘사분석 절차를 사용하여 탈카페인 녹차엽의 관능적 특성을 조사하였다.
- 소비자 기호도 검사를 위한 시료 제시 온도 및 제시 방법을 확립함.
- 20-30대 녹차 소비자 40-60명을 대상으로 제조공정에 따른 탈카페인 녹차 및 시판 녹차에 대한 소비자 기호도를 조사하였다.
- 묘사분석 결과에 대해 분산분석을 수행하고 제조공정에 따른 시료의 소비자 기호도를 파악하기 위하여 다변량 분석을 수행하였다.

#### 바. 탈카페인 소비자 기호도 조사결과에 따른 상품개발 가능성 분석

- 녹차 소비자 기호도를 조사결과를 바탕으로 상품개발 가능성을 분석하였다.
- 녹차제품을 생산 판매하고 있는 기존 산업체 조사를 통해 현 시장에서의 성공 가능성을 조사하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

## 제 1 절 식품산업에서의 탈카페인 기술

- 1970년대 이후 탈카페인 커피의 수요가 급증하여 1999년 미국기준으로 전체 커피소비량의 23%를 탈카페인 커피가 차지하며 40억 달러의 시장을 형성하고 있어(Ashihara, H. and A. Crozier, 2001) 인체에 무해한 초임계 이산화탄소를 이용한 공정의 이용이 점차 확대되고 있다.
- 1974년 독일에서 Kurt Zosel에 의해 초임계 상태의 이산화탄소를 이용하여 커피원두에서 카페인을 제거하는 기술이 최초로 개발하였다(독일특허 2,043,537, 미국특허 3,806,619).
- 그리하여 1980년대부터 미국의 Maxwell House에서는 초임계 이산화탄소를 탈카페인 커피 제조공정에 이용하고 있다.
- 현재 초임계 이산화탄소를 이용한 녹차엽의 탈카페인공정은 국내외를 막론하고 개발되어 있지 않은 실정이다.
- 다만, 녹차로부터 polyphenol성분인 catechin을 초임계 이산화탄소를 이용하여 분리하는 연구(Chang C. J., et al. 2000), 녹차엽에서 유래된 caffeine과 catechin의 분리(Bailey et al. 2001) 등은 최근에 보고되었다.
- 그 외, 최근에 새로운 추출방법으로 주목받기 시작한 초음파를 이용한 추출방법이 녹차에도 이용이 된 보고(Pan, X, et al. 2003)가 있으나, 에탄올, 메탄올 등을 이용하면 카페인과 catechin성분이 동시에 추출되는 문제점이 있다.

## 제 2 절 식품용 추출용매의 안전성

- 커피원두로부터 카페인을 제거하는 방법은 전통적으로 trichloroethylene, dichloromethane과 같은 유기용매가 쓰여 오다가 이들 전통적 유기용매의 발암 등의 유해성이 문제가 되어 현재는 ethyl acetate나 초임계 이산화탄소가 이용되고 있다.
- 초임계 이산화탄소는 1980년대 이후 홉, 커피, 각종 방향식물, 육류, 유제품으로부터 방향정유, 알칼로이드, 콜레스테롤, 지방, 레시틴 등의 친유성 성분을 분리하는 공정이 산업적으로 응용되고 있다.
- 바나나의 고유한 천연향을 주는 ethyl acetate는 식품에 이용되는 비교적 안전한 용매이다. 현재 커피의 탈카페인공정에 이용이 되고 있으나, 차엽의 탈카페인방법으로는 연구가 된 바가 없다.
- 녹차엽의 카페인을 ethyl acetate에 용해되므로, ethyl acetate를 이용해 탈카페인 녹차를 제조하기 위해서는 카페인의 추출을 최대화하고 catechin의 추출을 최소화하는 공정개발연구가 필요하다.

## 제 3 절 카페인의 생리학적 독성 관련 연구동향

- 신생 쥐의 뇌신경세포의 apoptosis가 caspase-3 의존하여 일어난다는 보고가 있다(Kang et al., 2002). 카페인이 들어간 녹차와 카페인 제거 녹차의 뇌신경세포 독성의 차이를 보는 것이 중요하다. 카페인 유도화합물인 nitrosocaffeidine의 장기간 노출 시 쥐의 소화관에서 암의

발생을 유도하였다(Ivanovic et al., 1998).

- 카페인 섭취로 인해 일어나는 인체에 대한 심혈관, 골밀도, 칼슘균형, 성인의 행동양식, 암발생 및 남성 생식능력에 대한 부정적인 영향이 보고되고 있고, 카페인에 특히 영향을 받는 대상인 가임연령에 속한 여성과 어린이는 카페인 섭취에 대한 주의를 요한다(Nawrot et al., 2003).

## 제 4 절 녹차의 향미 특성 및 관능 특성 연구 동향

- 국산녹차의 향기 성분에 관한 연구는 일부 이루어져 있으나(최성희 & 배정은, 한국영양식량학회지, 1996년), 다양한 분석 방법의 비교를 통한 효율적인 분석방법의 확립이 필요함. 또한, 녹차 내 향기활성 성분에 대한 분석과 주요 성분의 내부표준 물질 등을 이용한 정량적 고찰이 필요하다.
- 외국에서는 동시용매증류추출, 고체상미세추출, 용매 추출 등 다양한 방법을 이용하여 녹차의 향미 성분에 대한 연구가 이루어져 있으나, 이들 추출법에 대한 종합적이고, 체계적인 비교가 이루어져 있지 않다. 또한, 외국에서 이루어진 녹차에 대한 연구는 일본산, 중국산 및 일부 동남아시아산에 국한되어 있으며, 따라서, 국산녹차의 향미 성분에 대한 결과와는 차이가 있을 것으로 여겨진다.
- 녹차의 향미 특성의 기기분석 결과와 관능특성 분석 결과에 대한 상호비교적인 연구는 국내 외적으로 거의 미비한 실정이다.

### 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

# 제 1 절 카페인과 catechin의 추출용매 별 선택적 분리조건 최적화

## 1. Caffeine과 catechin의 선택적 분리조건 최적화

### 가. 초임계 이산화탄소에서의 선택적 분리도 측정

초임계 이산화탄소 추출시스템을 이용하여 catechin과 caffeine을 평형용해도를 측정함. 정밀하게 측정된 catechin을 cellulose fiber에 분산시켜 골고루 퍼지도록 추출용기(extraction cell)에 충전한 다음 초임계 이산화탄소 추출 시스템에 넣고 일정한 압력, 온도의 초임계 이산화탄소를 일정한 시간 동안 흘려보내면서 이산화탄소의 무게를 모니터링 하였다.

일정 시간이 지난 후 추출용기(extraction cell)에 남아 있는 catechin을 알코올에 녹인 후 그 용액을 HPLC로 분석하여 농도를 측정하고 총질량으로 환산하여 용해되어 손실된 catechin의 질량을 구하고 그 catechin 질량과 소비된 이산화탄소의 질량으로 나누어 평형 용해도를 결정하였다. 동일한 방법으로 caffeine의 이산화탄소에서의 평형용해도를 측정하였고 중요한 인자인 에탄올을 공동용매로 그 농도를 바꾸어 catechin 및 caffeine의 평형용해도를 측정하였음. 그리하여 동일한 조건에서 초임계 이산화탄소에 대한 catechin과 caffeine의 용해도가 얼마나 차이가 나는지를 비교하였다.

### 나. Ethyl acetate에서의 선택적 분리도 측정

시험관에 일정량의 ethyl acetate를 넣고 catechin 및 caffeine을 모두 함유하고 있는 Polyphenol 60을 충분히 흔들여 용해시키면서 침전이 일어날 때까지 계속적으로 가하였다. 침전이 생겨 더 이상 녹지 않게 되면 그 상등액을 취하여 membrane filter로 여과하여 침전물이 혼입되지 않도록 하고 여과액을 얻은 다음 일정량의 30% 에탄올 수용액으로 희석하여 HPLC로 분석하여 그 용액에서의 각 용질의 농도를 결정하였음. 그 농도를 용해도를 환산하였다.

### 다. 녹차 중 caffeine 및 catechin의 분석법 확립

2004년 7월 경에 출시된 보성산 두물 뉘음차(전남농업기술원 차 시험장, 전남 보성, 대한민국)를 시료로 채택하였다. 보성녹차의 뉘음차 제조공정에 따르면 첫 뉘음을 3번 정도 250℃에서 행하고 유념이라는 비비기 공정을 2번, 건조를 1번하는 과정에서 성분변화가 많고 비타민류의 손실과 새로운 향의 창출이 다른 차들에 비해 많지만 홍차에서와 같이 직접적인 발효를 통한 catechin 성분의 변화는 극히 미약한 것으로 보고된다(임근철, (前)전남농업기술원 차시험장장). 최적의 caffeine 및 catechin의 추출정도를 얻기 위해서 추출 온도와 시간, 용매의 변화를 행하였다. 이를 위한 표준화된 정량방법에 있어 쓸 만큼의 시료를 막자사발에 넣고 간 뒤 시료 입자크기를 균일화하기 위하여 400 μm의 sieve를 통과한 것을 200 mg weighing하여 100 ml 용량의 삼각 플라스크에 용매를 20 ml가하여 1%의 농도를 확보하였다..

추출온도와 시간의 일정한 조건을 위해 Shaking Water bath(100rpm)를 이용하였다. 사용한 온도는 35℃, 50℃, 65℃, 80℃, 시간은 15분, 30분 60분이다. 또한 용매는 물과 에탄올, 에틸아세테이트를 이용하였고 이들 세 용매를 섞어서 추출하기도 하였다. 그 섞은 정도는 10%, 30%, 50%를 물을 기준으로 하였다. 에탄올 100%의 경우 HPLC상의 추출이 되지 않았기 때문에 정량법에서 배제하였음. 또한 각각의 실험은 최소한 삼반복을 기본으로 하였다.

추출이 끝나면 이를 Filter paper(Advantec, 110mm)로 거른 용액을 13,000 rpm, 4℃에서 10분간 Centrifuge(Vision Science)하였다. 이를 0.5 $\mu$ m Syringe filter(Advantec, Hydrophilic PTFE)로 다시 걸러 4ml의 vial에 보관(-70℃)하였다.

본 실험에 사용된 HPLC 시스템은 Agilent 1100(Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)으로서 quaternary pump, micro degasser, variable wavelength detector, HPLC Chemstation software, column compartment, manual injector로 구성되었다. HPLC 분석 조건은 각각의 샘플 (20 $\mu$ l)을 Hypersil ODS column(Hypersil ODS, 5 $\mu$ m, 4.6  $\times$  100mm, Thermo Electron Corporation, Bellefonte, PA)에 주입하였다. Mobile Phase 2종(A, B)을 사용하여 gradient 조건으로 용출을 실시하였다. 이동상 A의 경우 0.5% Acetic acid in Water, B의 경우 30% Acetonitrile in 0.5% Acetic acid(A)로 행하였다. Gradient 조건으로는 B를 0%  $\rightarrow$  100%로 25분간 변화시키는 것이다. 매회 분석이 종료될 때마다 B가 100%에서 바로 0%로 바뀌는 것에 대한 안정화를 위해 5분간 A를 100%로 흘려주었다. Column compartment의 온도는 20℃를 사용하였으며 실험의 시작과 끝에 온도를 40℃으로 흘려주었다. Filter membrane으로는 A는 cellulose, B는 Nylon(Agilent)를 사용하여 여과하였다. Wavelength는 280nm으로 설정하였고, 안정화를 위해 1시간 정도 미리 켜두었다.

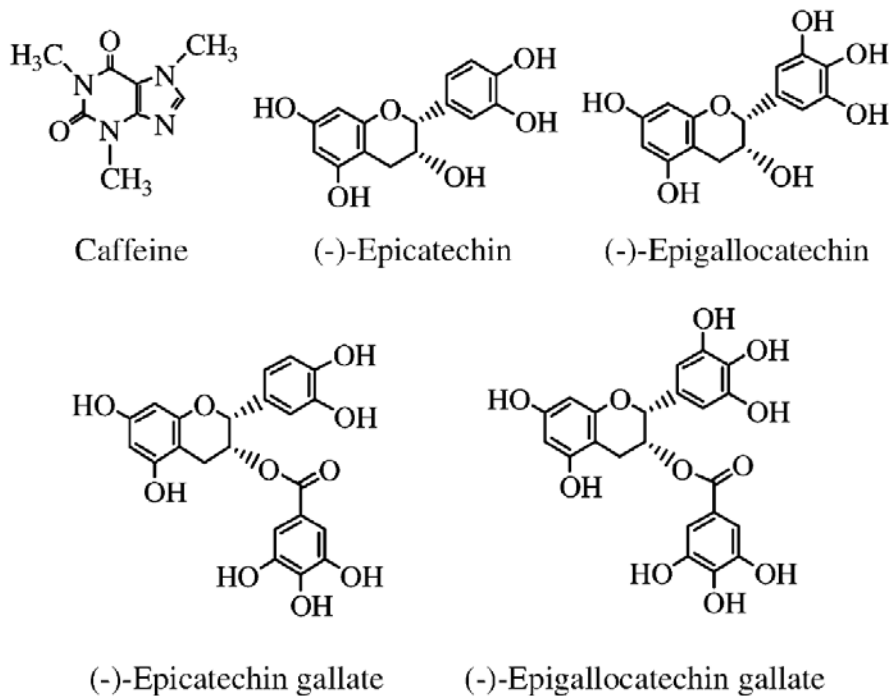


Fig. 1.1. Structures of the major catechins and caffeine found in green tea.



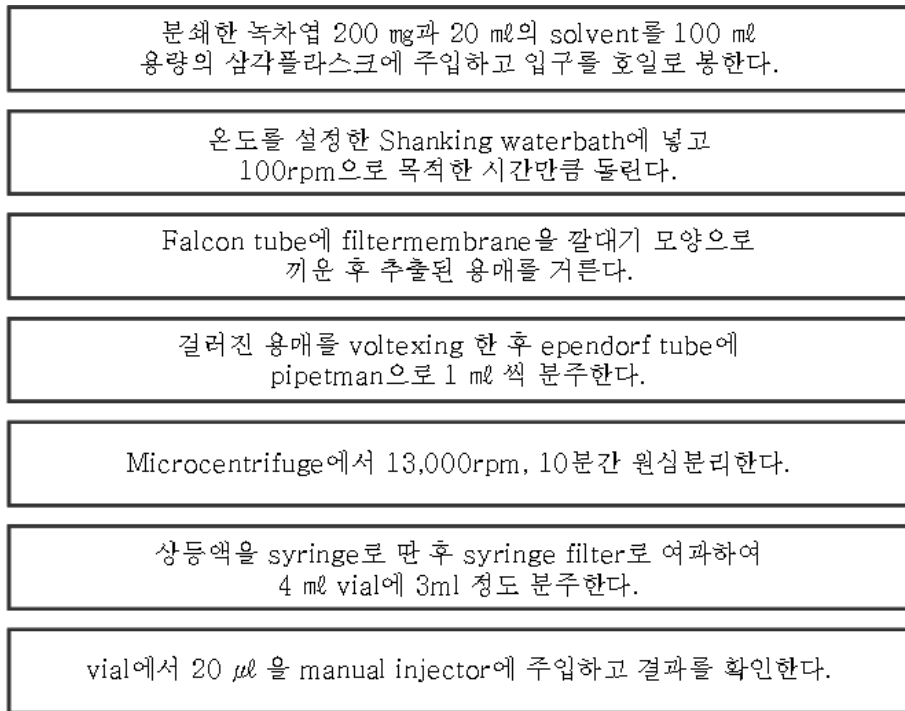


Fig. 1.2. Experimental procedures of analysis of catechins and caffeine in green tea.

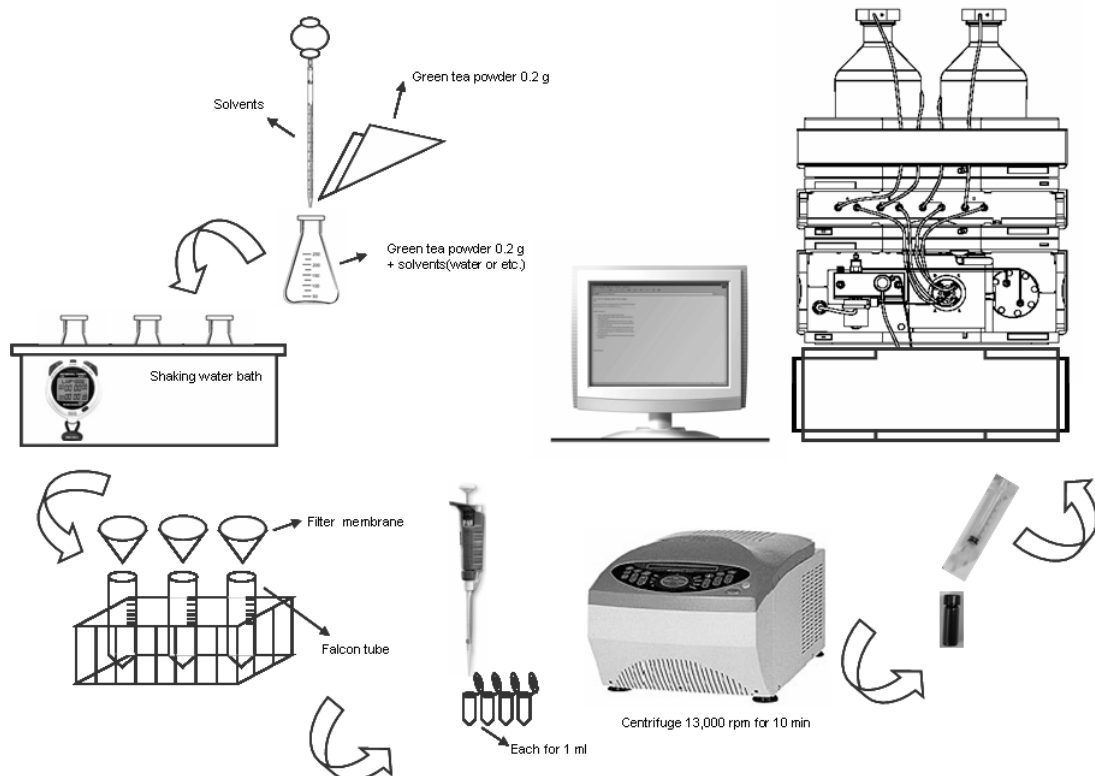


Fig. 1.3. Schematic diagram of quantitative analysis of catechins and caffeine in green tea.

또한 정확한 정량을 하기 위해 Calibration curve를 작성하였다. 사용된 표준시약은 Caffeine(100%), Epicatechin(EC)(97%), Epigallocatechin(EGC)(98.5%), Epigallocatechin gallate(EGCG)(94.4%), Epicatechin Gallate(EGC)(99.5%) (이상 Sigma Chemical Company, St. Louis, USA)의 시료를 2배씩 희석하여 calibration curve를 만들었다. 이를 통해 HPLC에서 분석된 각 시료들의 catechin 성분 및 caffeine의 peak 면적을 농도로 환산하여 최종적으로 정량하였다. 또한 시료 자체의 수분함량을 측정하여 이를 곱하여 처리하였다. 수분함량을 측정할 때에는 105°C dry oven에 24시간 두어 그 변화를 측정하였고 전체중량의 94.7%의 건체중량이 측정되었다. 역시 삼반복 이상을 기본으로 하였다.

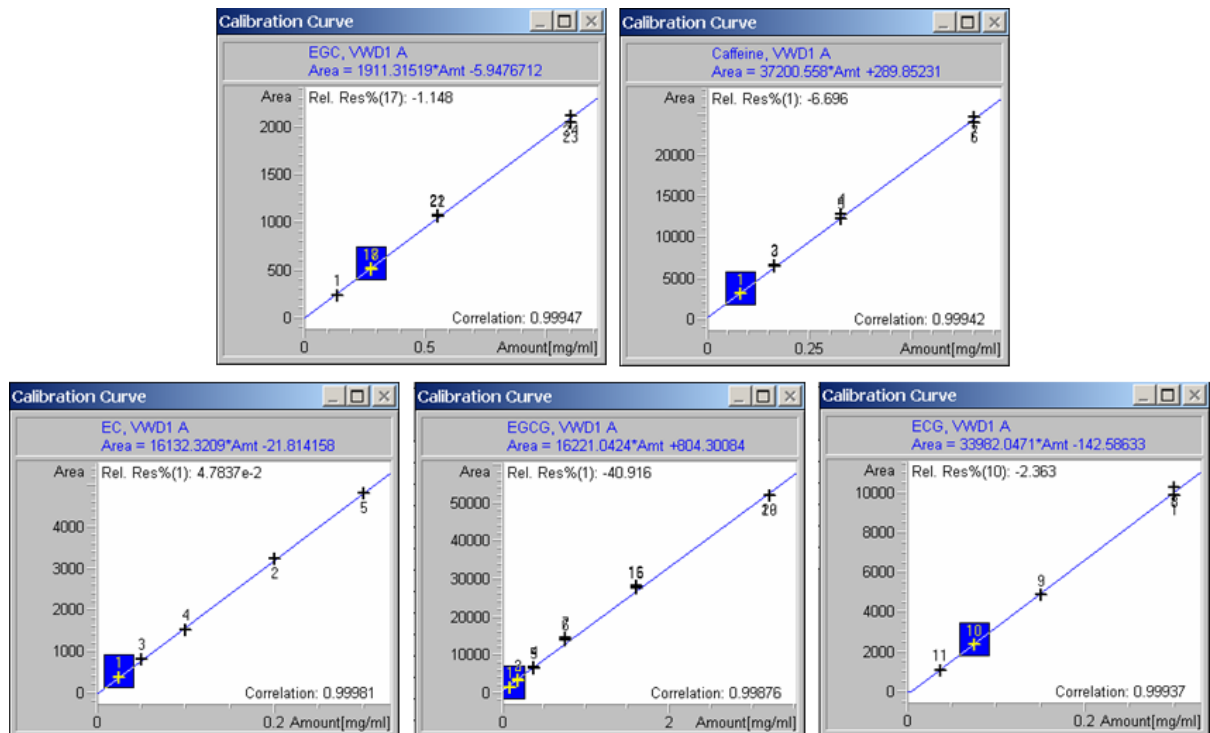


Fig. 1.4. Calibration Curves about Caffeine and 4 Major Catechins.

일반적으로 폴리페놀성분은 물, 열수(boling water), 에탄올, 메탄올 등을 이용하여 추출을 하므로 본 실험에서는 우선 물을 기본용매로 하여 녹차의 catechin, caffeine을 추출하여 정량하기 위한 실험을 실시하였다. 용매에 의한 녹차 시료의 추출시간을 길게 함에 따라 추출량이 늘어나고 어느 정도 시간이 경과 후에는 추출량이 더 이상 증가하지 않을 것으로 예상되기 때문에 추출량이 더 이상 증가하지 않는 최적의 추출시간을 찾기 위한 실험을 행하였다. 실험조건으로는 Water bath의 온도를 35°C로 100rpm으로 최적화하고 200 mg의 시료를 물에 넣어 추출하였다.

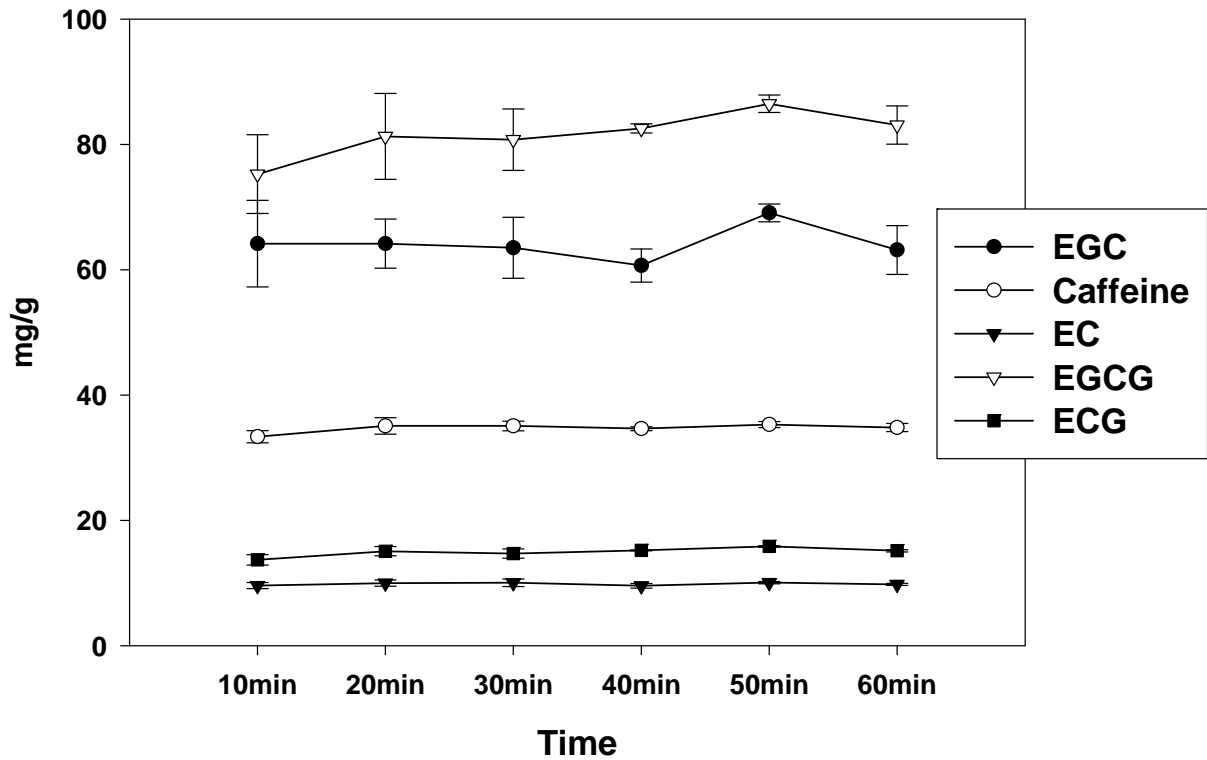


Fig.1.5. Effects of extraction time on the recovery yields of catechins and caffeine from green tea with water at 35°C. EC, ECG, EGC and EGCG stands for (-)-epicatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin, (-)-epigallo -catechin gallate, respectively.

추출 시간을 10분부터 증가시켰을 때 각 추출시간에서 변화하는 정도의 뚜렷함을 찾아낼 수 없었다. 다만 EGCG에서 추출시간 10분보다는 시간을 더 길게 하였을 때 미약하게 증가하는 경향을 볼 수 있었지만 30분 이후에는 거의 일정하였다. 따라서 이후의 물을 이용한 추출실험에서는 추출 시간을 30분으로 고정하여 추출실험을 실시하였다.

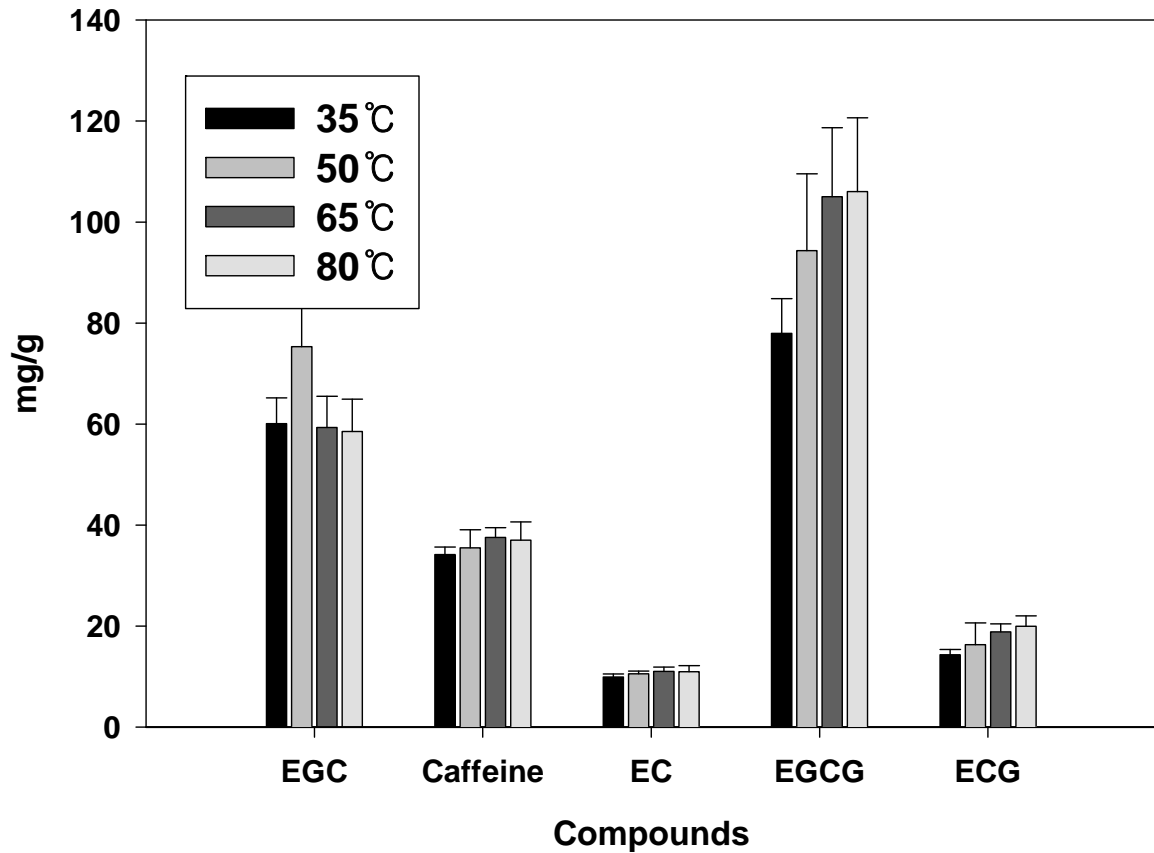


Fig.1.6. Effects of extraction temperature on the recovery yields of catechins and caffeine from green tea with water for 30 min. EC, ECG, EGC and EGCG stands for (-)-epicatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, respectively.

물을 용매로 하였을 때, 추출시간에 이어서 최적의 추출온도를 잡기 위한 실험을 행하였다. Fig. 1.6. 에서 보는 바와 같이 EGC를 제외한 나머지 4가지 성분들의 추출수율이 온도가 증가할수록 더 많은 성분이 추출되는 것으로 확인되었다. 이것은 이들 성분들이 온도가 높을수록 물에서의 용해도가 높고 각 용질의 물질전달 속도가 빨라지기 때문인 것으로 추측된다. 이러한 결과는 녹차를 더운 물로 우려내는 차 마시는 관습도 catechin 류를 충분히 추출하여 내기 위한 것으로 볼 수 있다. 추출온도가 65°C가 지나면서부터는 뚜렷한 증가를 보이지 않는 것을 볼 수 있었다. 특히 4가지 catechin 중 가장 많은 함량을 차지하는 EGCG의 함량의 경우 65°C이후로 별다른 변화가 없는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이후의 물을 용매로 한 catechin 및 caffeine 정량을 위한 추출실험에서는 최적 추출온도를 65°C 선정하여 사용하였다.

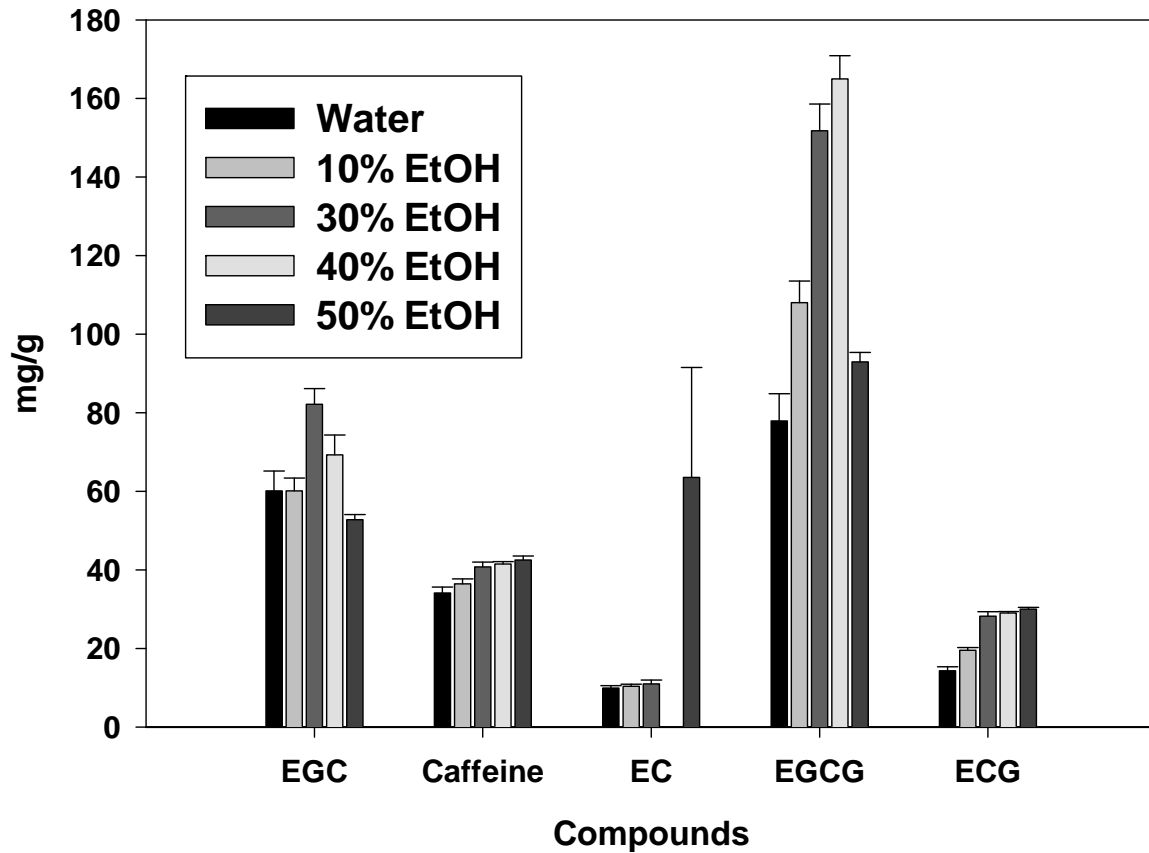


Fig.1.7. Effects of ethanol concentration (% v/v) in water on the recovery yields of catechins and caffeine from green tea with water for 30 min. EC, ECG, EGC and EGCG stands for (-)-epicatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, respectively.

물에 에탄올을 첨가하였을 때 순수한 물과 달리 어떠한 추출률이 나타날지 알아보기 위하여 에탄올 농도를 달리한 에탄올 수용액을 추출용매로 하여 추출을 실시하였다. 그 외 추출조건은 온도 35°C, 추출시간 30분이었다. 앞서서 행한 물의 경우 최적 추출온도가 65°C이었지만, 에탄올의 경우 포화용해도에 관여하는 것이 온도 외에도 용매 자체의 성질을 가질 수 있다는 가정 하에 앞서 물에 대한 실험처럼 35°C로 출발하였다. Fig. 1.7.에 제시된 것처럼 에탄올 수용액을 사용하였을 때 순수한 물을 사용하였을 때보다는 크게 증가된 추출률을 보여주었다. 특히 녹차에 가장 주요한 catechin인 EGCG의 경우 에탄올 30% 100% 가까운 추출 회수율의 증가율을 나타내었다. 이는 물보다는 극성이 다소 낮은 에탄올이 물에 가해짐으로서 에탄올 수용액 추출용매의 극성이 낮아져서 catechin류 중 다소 극성이 낮은 EGCG를 특히 잘 용해시켜 추출하여 낸 것으로 사료된다. 용매에 따른 각 성분의 추출정도가 명확하게 다를 수 있었다. 전반적으로 강한 추출정도를 보이지만 Fig. 1.7.에서 보는 바와 같이 특히 30%의 추출이 가장 잘되고 있음을 알 수 있다. 그런데 이 그림에서 40% 에탄올로 추출 시 EGCG가 30% 에탄올 수용액을 사용하였을 때보다 더 추출률이 높은 것으로 나타났지만, Fig. 1.9.에서 보는 바와 같이 40% 에탄올 추출 시에는 Fig.1.8의 30%

에탄올 추출물과는 달리, HPLC 분석 시에 EGCG와 coelution이 일어나며 peak의 broadening을 심히 발생시키는 극성이 비교적 낮은 물질의 추출로 인해 최적 에탄올 수용액 농도로 채택할 수 없었다. 또한 Auto Integration으로 적용된 30% 이후로는 peak이 broadening 했기 때문에 직접 Integration을 해주었지만, 이에 대한 추출량의 차이도 그리 크지가 않았기 때문에 최적 에탄올 수용액의 농도는 30%로 결정하였다.

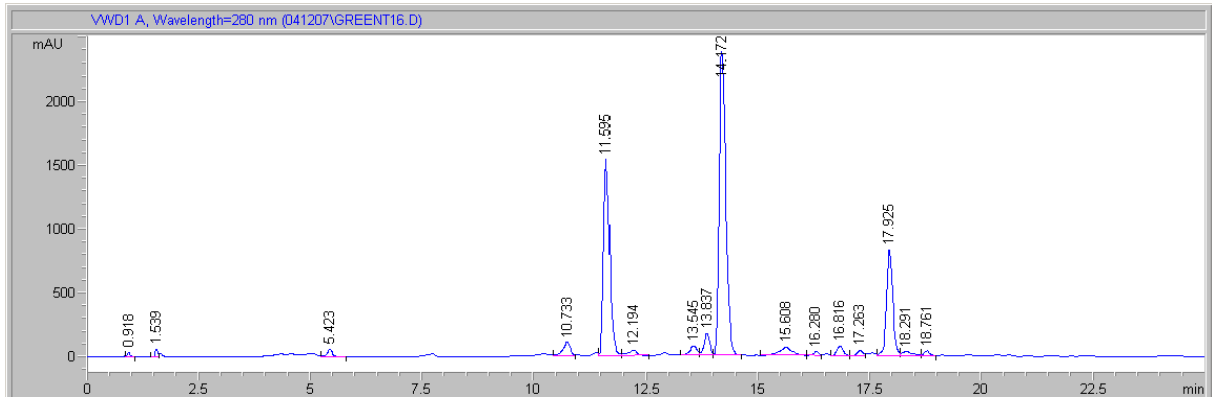


Fig. 1.8. chromatogram at 280 nm of the solvent phase from the partition of green tea extract in 30% ethanol.

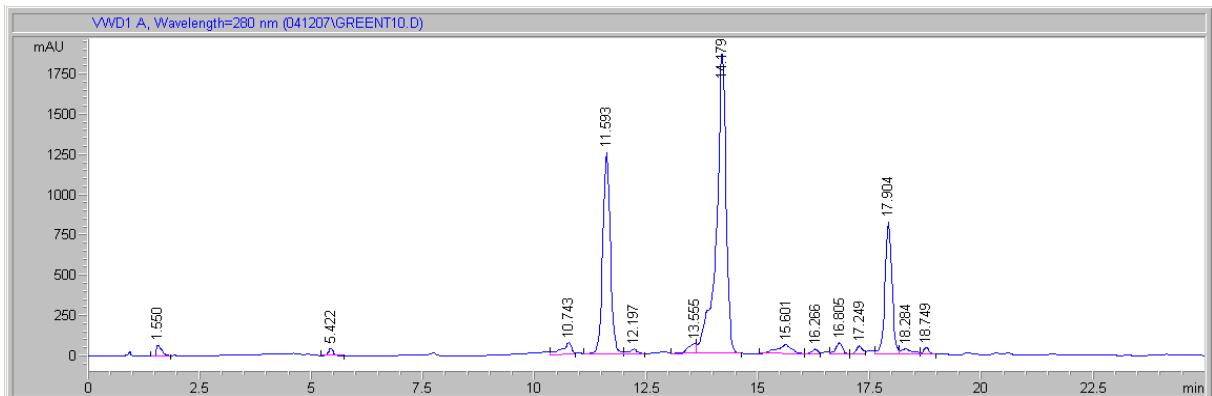


Fig. 1.9. chromatogram at 280 nm of the solvent phase from the partition of green tea extract in 40% ethanol.

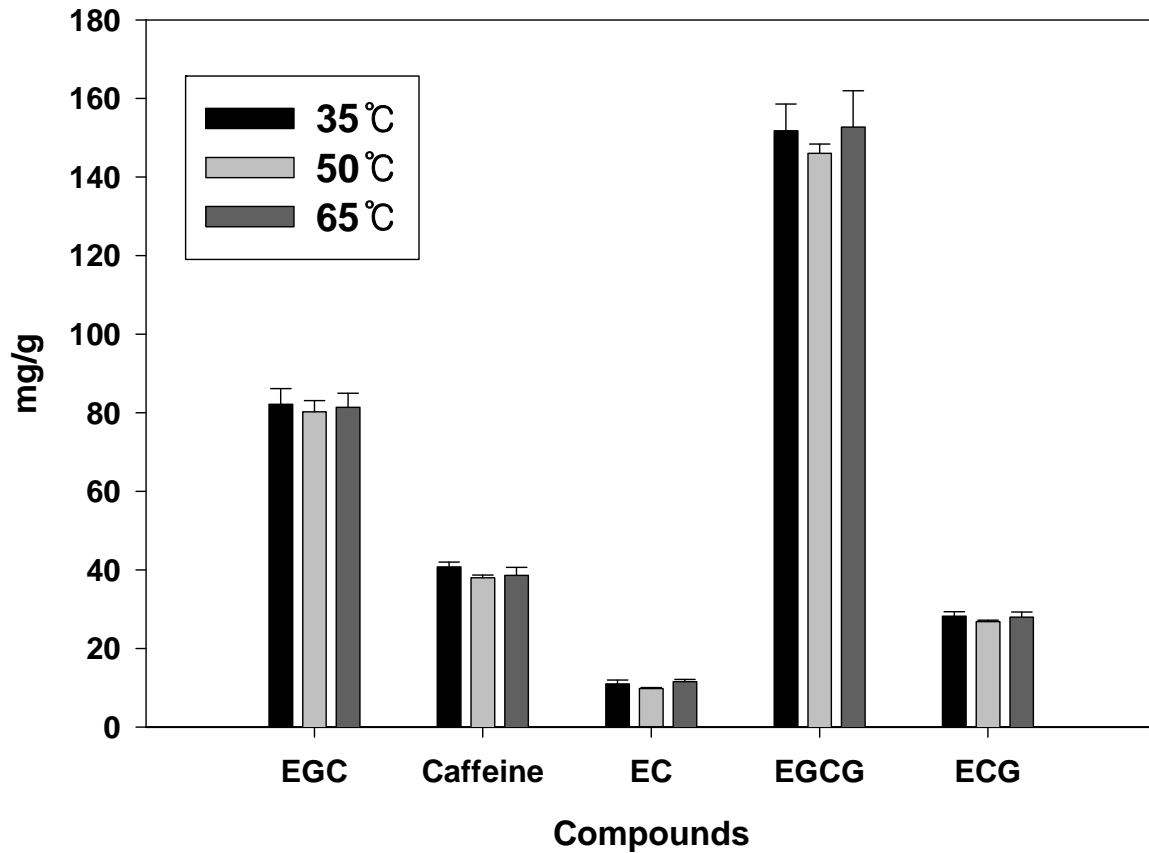


Fig.1.10. Effects of extraction temperature on the recovery yields of catechins and caffeine from green tea with aqueous ethanol solution (30%, v/v) for 30 min. EC, ECG, EGC and EGCG stands for (-)-epicatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallo- catechin, (-)-epigallocatechin gallate, respectively.

최적 추출용매로 결정된 30% 에탄올 수용액을 용매로 하여 에탄올 용매 사용시 최적 추출온도를 찾기 위한 실험을 행하였다. 앞에서 살펴본 바와 같이 추출용매를 물로 사용한 경우에는 온도의 변화에 따른 추출량이 증가함에 따라 변화했었다(Fig. 1.6). 그러나 에탄올 30%의 경우 온도 별 변화가 거의 없는 결과가 나왔다. 이는 에탄올 수용액을 사용하였을 때는 비교적 낮은 온도에서도 catechin과 caffeine의 용해도가 물에서보다 훨씬 높아 실험한 온도범위에서는 포화용해도가 온도의 영향을 크게 받지 않기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 에탄올 수용액을 추출용매로 사용할 때의 최적 추출온도는 35°C로 결정하였다.

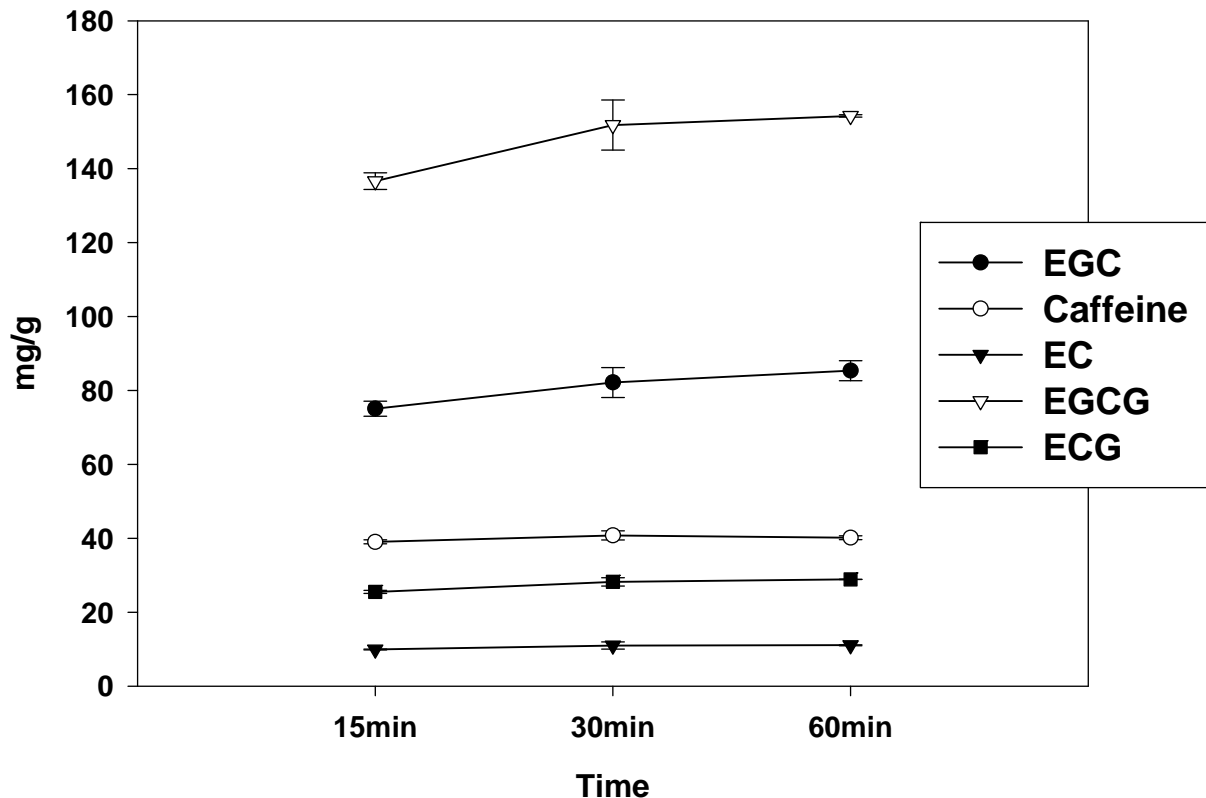


Fig. 1.11. Effects of extraction time on the recovery yields of catechins and caffeine from green tea with aqueous ethanol solution (30%, v/v) at 35°C. EC, ECG, EGC and EGCG stands for (-)-epicatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, respectively.

에탄올 수용액 30% (v/v)을 추출용매로 하여 35°C에서 추출하면서 최적 추출시간을 결정하기 위한 실험을 실시하여 Fig.1.11.과 같은 결과를 얻었다. 추출시간에 따른 추출물의 변화에 있어서 물을 용매로 했을 경우와 같이 에탄올 수용액의 경우도 추출시간 30분 이후부터는 더 이상의 커다란 변화를 보이지 않음을 알 수 있었다. 따라서 최적 추출시간은 30분으로 선정하였다. 이상과 같이 녹차의 catechin류 및 caffeine을 정량하기 위한 최적 실험조건은 추출용매 30%(v/v) 에탄올 수용액(30% ethanol in water, v/v), 추출온도 35°C, 추출시간 30분으로 결정하였다.

일반적으로 녹차의 중요 구성성분인 EC와 EGCG는 retention time이 근접하여 존재하므로 같이 coelution이 되어 peak의 분리가 잘 되지 않는 경우가 많다. 따라서 본 실험에서는 분석의 정확성을 기하기 위하여 이들 두 가지 성분의 peak를 분리하기 위해 HPLC 컬럼의 온도를 최적화하였다. 일반적으로 컬럼의 온도를 낮추면 peak의 분해능은 향상되지만 elution time이 증가하고 컬럼 내의 압력이 상승하는 문제 또한 수반한다. 아래 Fig. 1.12.에서 보는 바와 같이 컬럼 온도가 40°C 일때는 분리도가 낮지만 컬럼의 온도가 낮아짐에 따라 retention time이 바뀌게 되며(Fig. 1.13., Fig. 1.14.) 컬럼의 온도를 20°C로 낮추었을 때는 크게 높아지는 것을 알 수 있었다.(Fig. 1.15.) 따라서 녹차의 분석을 위한 실험에서 컬럼의 온도는 항상 20°C로 설정하였다.



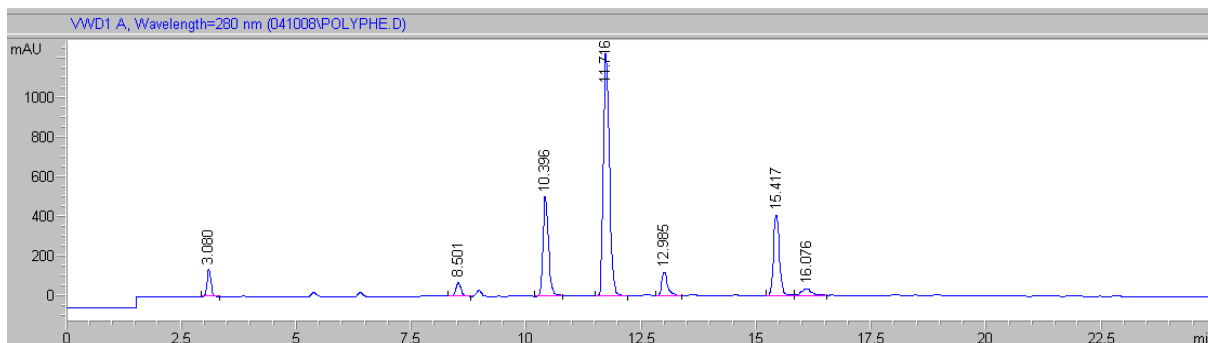


Fig. 1.12. Analytical separation chromatography of polyphenon 60 at 280 nm from column compartment temperature at 40°C.

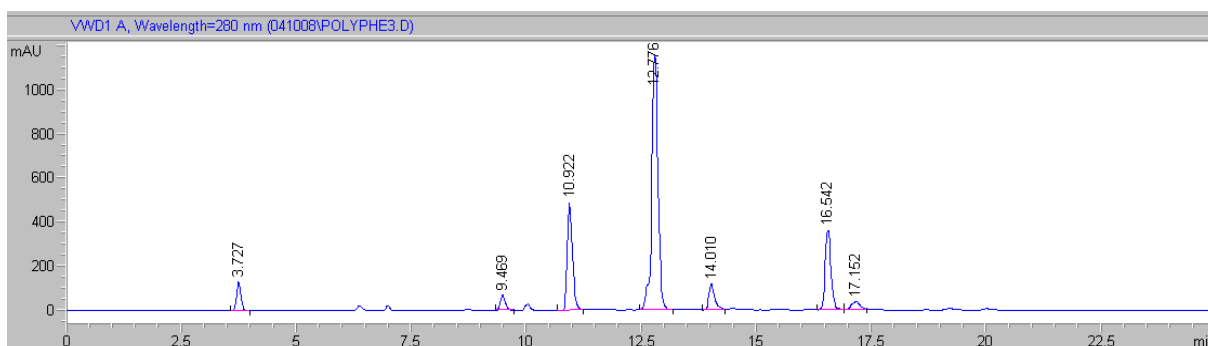


Fig. 1.13. Analytical separation chromatography of polyphenon 60 at 280 nm from column compartment temperature at 30°C.

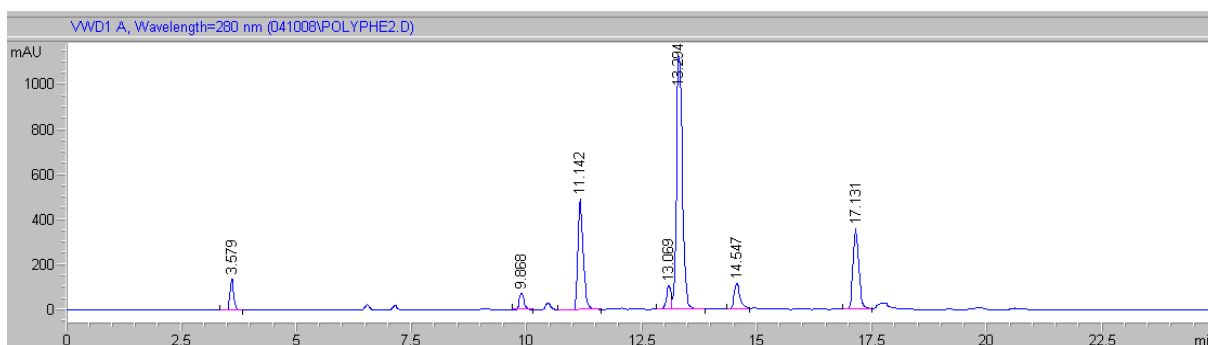


Fig. 1.14. Analytical separation chromatography of polyphenon 60 at 280 nm from column compartment temperature at 25°C.

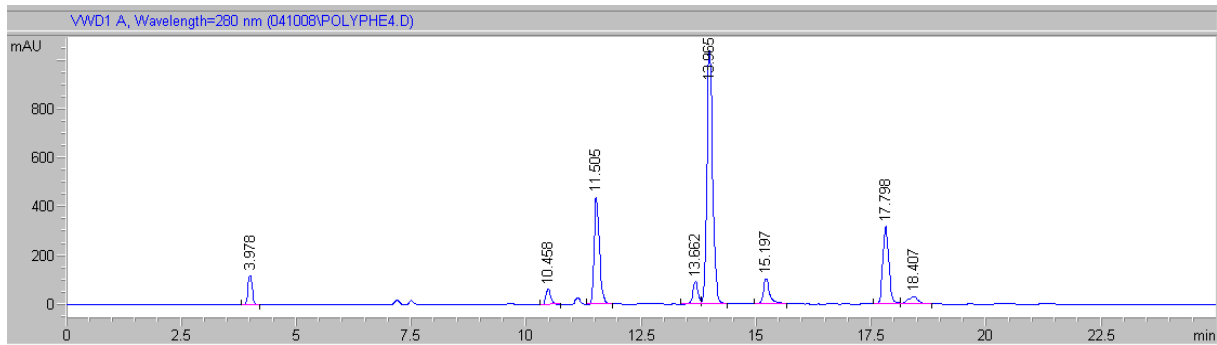


Fig. 1.15. Analytical separation chromatography of polyphenon 60 at 280 nm from column compartment temperature at 20°C.

]

Item	Condition
Solvent	30% EtOH(v/v)
Time	30 min
Temperature	35°C
Column Temp	20°C

Component	content(mg/g)
EGC	82.15 ± 4.03
Caffeine	40.75 ± 1.25
EC	11.00 ± 0.97
EGCG	151.80 ± 6.80
ECG	28.21 ± 1.13
Total	313.91 ± 14.18

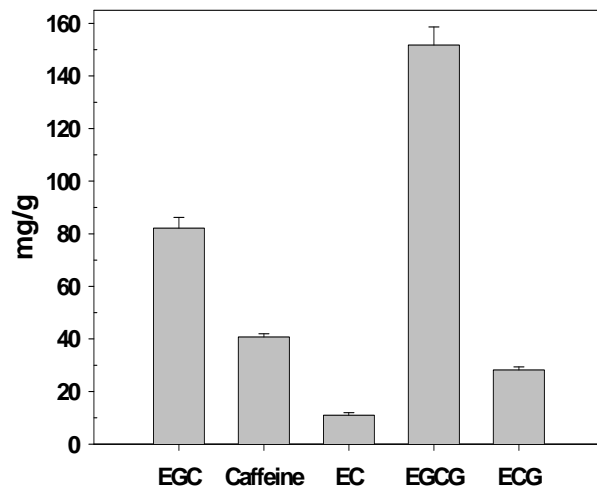


Fig. 1.16. The optimum condition about green tea extraction.

라. 초임계 이산화탄소에서의 선택적 분리조건 최적화

녹차의 주요 구성성분 중 4가지 catechin과 caffeine의 선택적 분리도를 결정하기 위하여 평형상태에서의 용해도를 측정하였다. Fig. 1.18.에서 보는바와 같이 extractor에 catechin과 caffeine 일정량을 균일하게 packing을 한 후 일정시간 동안 40°C의 초임계 이산화탄소를 흘려보내주는 dynamic extraction 방식을 이용하여 용해도 측정을 실시하였다. 추출하는 동안에 소모되는 이산화탄소의 양은 전자저울을 이용하여 이산화탄소 용기의 무게를 모니터링하여 결정하였고 용해된 용질의 양은 추출이 끝난 다음 extractor안에 남아 있는 용질을 30% ethanol로 용해시킨 후 그 용액의 농도를 HPLC로 분석하여 측정하였다. 이리하여 용질의 초임계 이산화탄소에서의 용해도는 extractor에서 손실된 용질의 질량을 extractor 및 separator를 흘려간 이산화탄소의 질량과 손실된 용질의 질량의 합으로 나누어 계산하였다(Eq. 1).

$$y = \frac{n_{solute}}{n_{solute} + n_{CO_2}} \quad (\text{Eq. 1})$$

where  $y$  : equilibrium solubility of solute

$n_{solute}$  : moles of solute extracted

$n_{CO_2}$  : moles of  $CO_2$  passed



Fig. 1.17. A picture of Supercritical fluid carbon dioxide instrument.

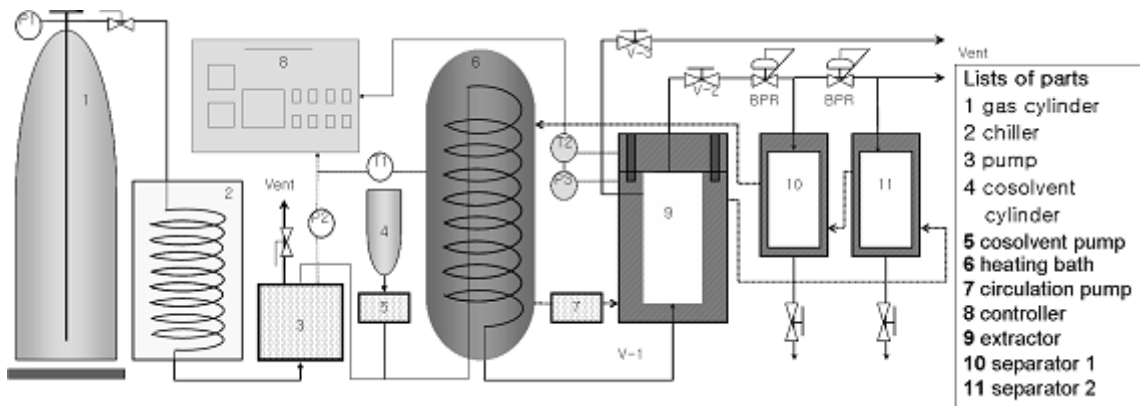


Fig. 1.18. Schematic diagram of a supercritical carbon dioxide extraction system.

Fig. 1.19.에서 보는 것처럼 압력을 증가시킬수록 caffeine의 초임계 이산화탄소상에서의 용해도는 증가하였다. 80 bar에서 130 bar의 위에서 평형용해도를 측정하였을 때  $3.9 \times 10^{-5}$ 에서  $5.3 \times 10^{-3}$ 까지의 용해도 (y, 몰분율)을 나타내었으며 압력이 증가할 수록 용해도 또한 증가하는 양상을 나타내었다.. 이것은 압력이 증가할수록 이산화탄소의 밀도가 높아져서 용매로서의 용해력이 증가하는 이른바 density effect에 의한 solvating power의 향상 때문이라 할 수 있다. 그리고 caffeine은 초임계 이산화탄소에 혼합되는 에탄올의 양이 증가할수록 같은 압력에서 caffeine의 용해도가 증가하는 양상을 보였다. 이러한 결과는 순수한 이산화탄소로만 이루어진 초임계 이산화탄소는 극성이 너무 낮아 잘 용해되지 않지만 에탄올이 혼합되어 초임계 이산화탄소의 극성이 증가할수록 극성이 비교적 높은 caffeine의 용해도가 증가하는 것으로 알 수 있다. 따라서 caffeine과 같은 비교적 극성이 높은 물질을 추출할 때에는 에탄올이나 물과 같은 극성용매를 공동용매(cosolvent)로 첨가하여야 할 것이다.

Fig. 1.19.에서 보는 것처럼 epicatechin(EC)의 용해도 또한 압력을 증가시킬수록 초임계 이산화탄소상에서의 용해도는 증가하였다. 80 bar에서 130 bar의 위에서 평형용해도를 측정하였을 때  $3.6 \times 10^{-5}$ 에서  $2.1 \times 10^{-3}$ 까지의 용해도 (y, 몰분율)을 나타내었다. 그리고 같은 압력과 공동용매 농도 조건에서 caffeine에 비하여 EC의 용해도는 크게 낮게 나타났다. 이것은 EC의 극성이 caffeine에 비하여 더 높아 극성이 낮은 초임계 이산화탄소에 덜 용해되는 경향을 나타내기 때문인 것으로 생각된다. 동일한 조건(압력, 온도, 에탄올 공동용매 농도)에서 의미있게 차이나는 caffeine과 catechin의 용해도 차이는 초임계 이산화탄소를 이용하면 caffeine과 catechin류의 분리할 수 있다는 것을 제시한다. 더 나아가 녹차에 초임계 이산화탄소를 용매로 추출하면 동일조건에서 caffeine을 최대량 추출하고 잘 용해되지 않아 추출 회수율이 낮은 catechin류의 추출손실률을 최소로 하는 공정최적화를 이룩한다면 친환경, 무독성의 초임계 이산화탄소를 이용하여 녹차로부터 선택적으로 caffeine만 제거하는 탈카페인공정을 개발할 수 있을 것이다. 다만 식물 세포조직 내에 존재하는 용질의 추출과 평형상태에서의 용해도 측정과는 크게 다른 추출 양상을 나타낼 것으로 예상된다. 이는 세포조직 내에 여러 가지 방해물(barrier)이 존재하는 실제 식물조직에서는 용해도 이외에도 물질의 전달현상이 크게 중요하기 때문에 온도, 압력 이외에도 시료입자의 크기, 이산화탄소의 유속 등도 추출속도에 크게 영향을 미칠 것으로 예상되기 때문에 실제 녹차 시료를 이용한 이에 대한 심도 있는 연구가 이루어져야 할 것이다.

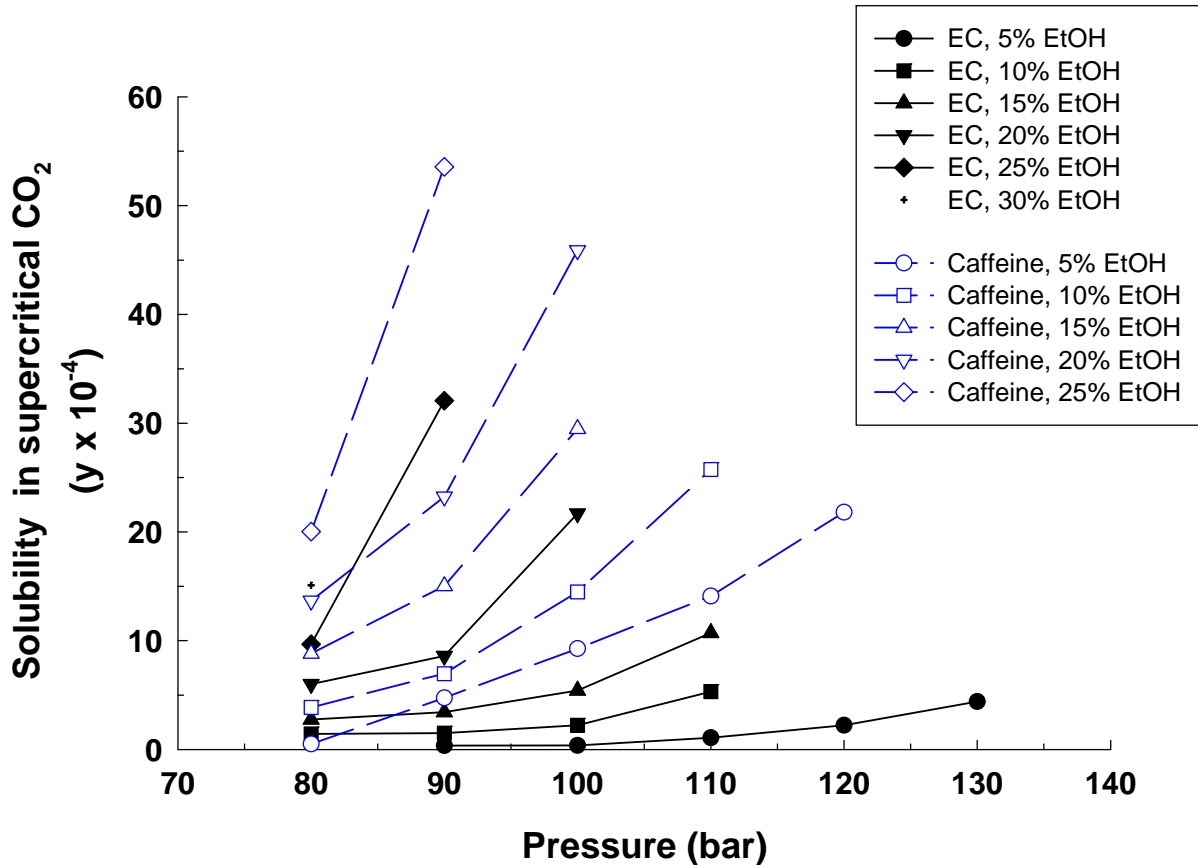


Fig. 1.19. Equilibrium solubility of epicatechin (EC) and caffeine in supercritical carbon dioxide modified with ethanol (EtOH) at different concentrations at 40°C.

마. Ethyl acetate에서의 선택적 분리도 측정

Sigma Cematical Company에서 구입한 catechin과 caffeine 표준물질을 각각 ethyl acetate의 함량을 달리한 ethyl acetate-ethanol 수용액 용매에 녹여 침전이 생길 때까지 과포화상태를 만들었다. 포화용해상태의 상등액을 취하여 membrane filtration을 통해 침전물을 완전히 제거한 후 그 여과액을 회석하였다. 그렇게 회석된 여과액을 HPLC에 injection 한 후 기존에 만들어 놓은 calibration curve와의 비교를 통해 농도를 측정하고 구해진 농도를 용해도로 환산하여 Ethyl acetate에서의 평형용해도를 결정하였다. 본 실험에 사용된 HPLC 시스템과 Calibration curve는 caffeine과 catechin의 선택적 분리도 최적화 실험과 동일하게 하였다.

Ethyl acetate 에탄올 수용액은 일반적으로 커피의 탈카페인공정에 쓰이는 용매이다. 본 연구에서도 Ethyl acetate 에탄올 수용액을 용매로 이용하기 위한 목적으로 이 용매에 대한 평형상태에서의 용해도를 측정하였다. Merk Index에 따르면 ethyl acetate의 평형용해도가 물에는 3.3%(v/v), 에탄올에는 9.0%(v/v)의 용해도를 갖기 때문에 본 실험에서는 단일상(single phase)의 용매를 만들기 위하여 이들 용해도 보다 낮은 ethyl acetate 수용액인 4% ethyl acetate in 30%(v/v)과 9% ethyl acetate in 30%(v/v)을 용매로 만들어 실험에 사용하였다.

Fig. 1.20.에서 보는 바와 같이 caffeine은 1ml의 용매에 113mg 및 139mg의 용해도를 보여 364mg 및 399mg의 용해도를 보인 catechin보다 낮은 용해도를 보였다. 그리고 ethyl acetate의 농도를 높였을 때는 catechin과 caffeine의 용해도가 모두 증가하는 양상을 나타내었다. 위의 결과에서 나타난 것처럼 일단 ethyl acetate 에탄올 수용액이 caffeine을 잘 용해시키기기 때문에 실제 녹차엽의 탈카페인에는 우수한 능력을 보일 것으로 생각된다. 그러나 catechin도 높은 용해도를 나타내었기 때문에 실제 녹차엽의 탈카페인 실험에서는 단일상을 나타내는 ethyl acetate의 농도보다 더 농도를 높인 상태의 ethyl acetate 에탄올 수용액을 용매로 하여 분획추출을 통한 용매의 조성을 최적화하여 catechin을 최소로 용해 및 추출시키는 공정을 개발하여 최대로 caffeine을 제거하고 catechin은 최대로 보존토록 하여야 할 것이다.

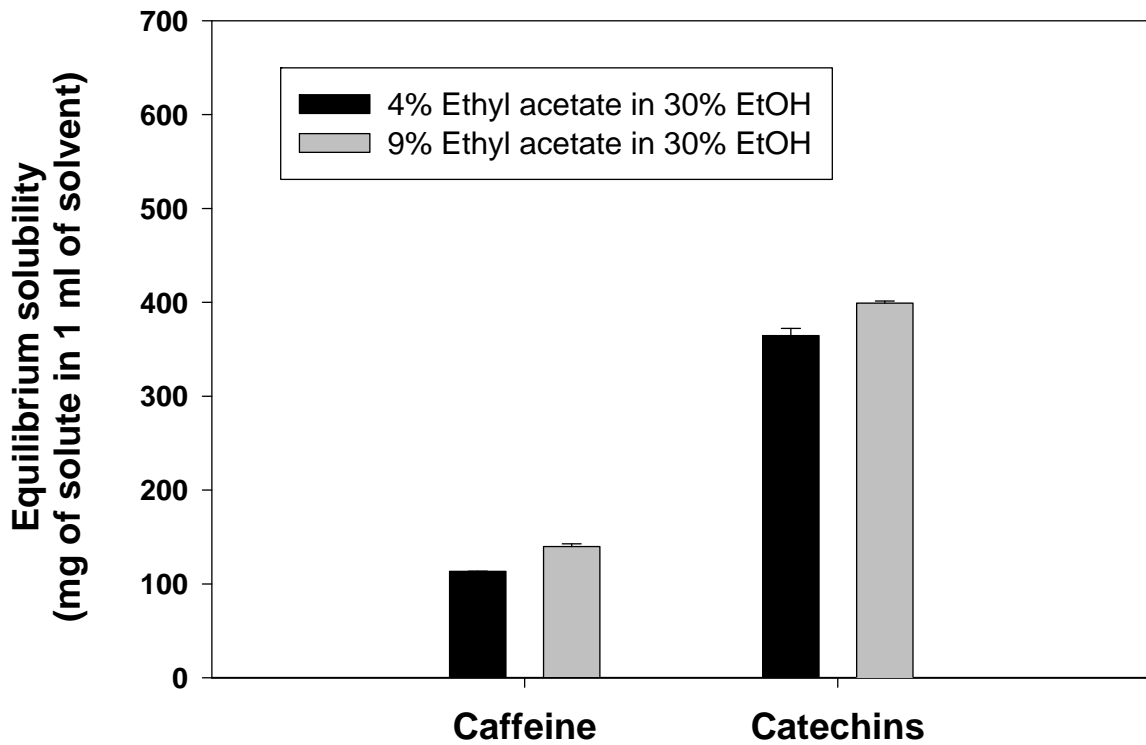


Fig. 1.20. Equilibrium solubility of caffeine and catechins in 4% ethyl acetate in 30%(v/v) and 9% ethyl acetate in 30%(v/v) at 25°C.

## 제 2 절 녹차엽의 탈카페인 공정의 개발

### 1. 녹차 중 caffeine 및 catechin의 분석

분석에 사용된 녹차는 1절에서 사용한 녹차와 동일한 녹차를 사용하였다.

녹차 중 Caffeine 및 Catechin의 최적 분석 방법은 이미 1절 실험에서 얻은 실험결과와 똑같은 방법으로 수행하였다. 그것에 대한 결과는 Table 2.1을 통해 확인 할 수 있다.

Table 2.1 Composition of green tea used in this study

Component	Caffeine	EGGC	EGC	EC	ECG
mg / g (Dry weight)	41.38 ± 0.41	145.28 ± 0.89	81.52 ± 3.72	6.01 ± 0.14	27.26 ± 0.49

## 2. 초임계 이산화탄소이용 녹차엽의 선택적 탈카페인 추출조건 확립

### 가. 실험 목적

본 실험에 따른 카페인 제거된 녹차엽 분말의 제조방법은 최종 잔류시에도 인체에 무해한 조용매를 사용하고, 초임계 이산화탄소를 주용매로서 사용하며, 상기 조용매와 주용매의 비율을 조절하는 것에 의해 녹차엽 분말과 상기 주용매 간의 카페인과 카테킨의 분배계수를 조절함으로써 녹차엽 분말에 함유된 카페인을 최대한 제거하면서 유용성분인 카테킨의 소실을 최소화하는 것을 목적으로 한다.

이하, 본 실험의 방법을 단계별로 설명하면 다음과 같다.

- 초임계 이산화탄소를 이용한 녹차엽의 선택적 탈카페인 추출조건 확립
  - 공동용매(물, 에탄올)의 영향
  - 추출온도의 영향
  - 추출압력의 영향
  - 물질전달요소(유속, 시료입자의 크기)의 영향
- 최대의 카페인 추출, 최소의 catechin추출가능 최적 조건 확립
  - 추출공정변수의 최적화

### 나. 재료 및 장비

2004년 7월 경에 출시된 보성산 두물 덩음차(전남농업기술원 차 시험장, 전남 보성, 대한민국)를 시료로 채택하였다. 보성녹차의 덩음차 제조공정에 따르면 첫 덩음을 3번 정도 250℃에서 행하고 유념이라는 비비기 공정을 2번, 건조를 1번하는 과정에서 성분변화가 많고 비타민류의 손실과 새로운 향의 창출이 다른 차들에 비해 많지만 홍차에서와 같이 직접적인 발효를 통한 catechin 성분의 변화는 극히 미약한 것으로 보고됨(임근철, (前)전남농업기술원 차시험장장).

본 실험에 사용된 초임계 이산화탄소 추출장치(Ilshinautoclave, Deajeon, KOR)는 extractor 용량 100ml, separator 용량 100ml, 최대압력 350 bar, 최대온도 80℃ 까지 설정이 가능하고 이산화탄소(Deahan specialty gases, KOR)는 순도 99.5%로 싸이폰 실린더를 통해 액체상 부분이 펌프로

공급되도록 하였다. 추출기 및 파이프의 모든 금속은 stainless steel 재질로 만들어졌다.

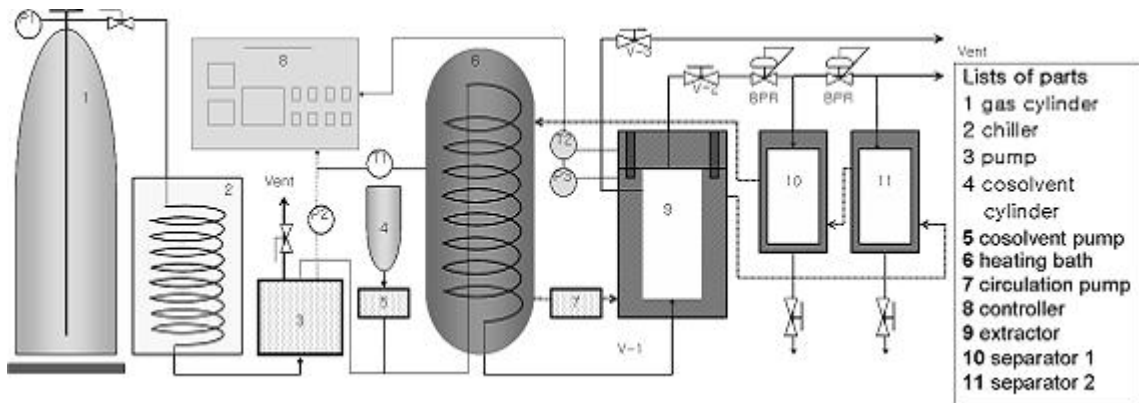


Fig. 2.1. Schematic diagram of a supercritical carbon dioxide extraction system used in this study.

#### 다. 실험 방법 및 결과

##### 1) 조용매 영향 실험

건조된 녹차엽(두물차, 보성녹차시험장, 한국) 20g을 Cutting mill(IKL, IK2836000, KOR)로 분쇄한 후 particle size analyzer를 이용하여 평균 입자크기  $543.7\mu\text{m}$  입자를 추출시료로 사용하였다. 상기에서 분쇄된 녹차 중 10g을 취하고 이산화탄소 100g 당 water 95% EtOH(v/v)을 2.3, 4.6, 7.0g의 비율로  $\text{CO}_2$ 에 대한 조용매 비율을 달리하여 조용매의 추출에 대한 영향을 알아보았다.

조용매에 침지된 녹차를 100ml의 초임계 추출용기에 넣고 추출압력 300bar, 추출온도  $70^\circ\text{C}$ , 이산화탄소 유속  $8.5\text{g}/\text{min}$ 의 조건으로 초임계유체 추출을 40분간 수행하였다. 이때 초임계이산화탄소의 Residence Time은 8.34 min이다. 초임계 유체의 추출용기 내 Residence Time이란 추출용기 내의 시료의 공극과 빈 공간의 합을 이산화탄소의 부피 이동속도로 나누어서 구한 값이다. 다음으로, 상기 조용매 침지 및 초임계유체 추출단계를 동일한 조건으로 3회 반복 수행하였다. 마지막으로 상기 녹차엽 분말을 회수하고  $105^\circ\text{C}$ 의 건조오븐에서 12시간 동안 건조하여 수분 및 에탄올 성분을 제거한 후 전술한 방법으로 녹차 내 남아있는 성분들을 HPLC로 정량 분석하였다. 그 결과는 아래 표와 같다.



Table 2.2 Supercritical CO<sub>2</sub> extraction yields of caffeine and catechins from green tea leaves with mean particle sizes of 543.7 μm when operated at a CO<sub>2</sub> flow rate of 8.5 g/min, a pressure of 300 bar, and a temperature of 70°C for 120 min with cosolvents

Cosolvent	Extraction yield									
	(mg component/g dry green tea)					(mg component/kg total CO <sub>2</sub> used)				
	Caffeine	EGCG	EGC	ECG	EC	Caffeine	EGCG	EGC	ECG	EC
No Cosolvent	3.7±0.5	19.2±2.1	11.9±0.2	3.4±0.6	1.0±1.1	34.8±0.5	178.3±2.1	111.1±0.2	32.0±0.6	9.9±1.1
Water, 2.9 g	6.2±0.4	46.2±2.5	37.9±2.2	6.1±0.9	0.6±0.4	57.5±0.4	429.1±2.5	352.2±2.2	57.3±0.9	5.5±0.4
Water, 5.8 g	16.9±0.1	72.1±0.4	54.1±1.0	11.9±0.0	3.5±0.0	156.8±0.1	669.4±0.4	502.2±1.0	110.9±0.0	32.5±0.0
Water, 8.8 g	31.1±0.3	100.3±1.8	74.6±0.2	15.7±0.2	5.4±0.3	288.5±0.3	930.6±1.8	693.0±0.2	146.1±0.2	50.1±0.3
EtOH, 2.3 g	28.7±0.3	63.1±5.2	55.0±1.1	12.0±0.7	1.7±0.1	266.5±0.3	585.7±5.2	510.8±1.1	111.9±0.7	16.3±0.1
EtOH, 4.6 g	35.0±0.1	77.6±1.7	55.4±0.9	15.5±0.1	1.0±0.1	325.6±0.1	720.8±1.7	513.9±0.9	144.1±0.1	9.3±0.1
EtOH, 7.0 g	40.3±0.2	90.4±0.1	65.0±2.2	19.1±0.2	2.6±0.6	373.9±0.2	838.8±0.1	603.9±2.2	177.4±0.2	24.8±0.6

<sup>a</sup> Each green tea sample was extracted in triplicate, each extract was analyzed by HPLC in duplicate, and the calculated extraction yields were expressed as means standard deviations.

Table 2.2를 보면 조용매의 농도와 양을 달리 했을 때 카페인 및 카테킨이 추출되는 양이 서로 다른 결과를 알 수 있다. 특히 4.6g 95% EtOH(v/v)/ 100g of CO<sub>2</sub>와 5.8g water/100g of CO<sub>2</sub>를 비교해 보면 같은 농도이지만 카페인의 제거량은 조용매로 에탄올을 사용했을 때가 물을 사용했을 때 보다 2배 이상 많이 제거되었고 녹차 중의 유용한 성분인 EGCG는 오히려 물을 사용했을 때 더 많이 제거되는 것으로 나타났다. 이는 에탄올보다 극성이 더 높은 물을 조용매로 사용시 CO<sub>2</sub>의 극성을 더 높여줘 카페인보다 극성이 더 높은 EGCG가 더 잘 추출되었던 것으로 사료된다.

본 실험에서 초임계이산화탄소의 극성을 조절해주기 위한 최적 조용매를 찾고자 인체에 별로 유해하지 않은 에탄올과 물을 각각 농도를 달리하여 비교 실험하였다. 그 결과 위의 표를 보면 알 수 있듯이 7.0g 95% EtOH(v/v)/ 100g of CO<sub>2</sub> 를 조용매로 사용했을 때 카페인이 가장 많이 추출된 것을 알 수 있고 에탄올 대신에 물을 사용하는 때에는 동일 조용매의 농도에서 카페인이 훨씬 적게 추출되었음을 알 수 있으며, 물을 사용하게 되면, 녹차엽 분말에서 카테킨의 소실율이 카페인의 소실율과 동일하거나 오히려 높기 때문에 카페인만을 선택적으로 제거할 수 없다는 것을 확인할 수 있었다. 그 이유는 앞서서도 기술한 바와 같이 Fig.1.1.의 카페인과 카테킨의 분자 구조를 보면 알 수 있듯이 카페인이 카테킨류보다 상대적으로 비극성이 강하다. 그래서 카페인은 비극성 물질에 잘 녹기 때문에 비극성이 강한 이산화탄소와 물보다 비극성이 강한 에탄올을 조용매로 이용하게 되면 상대적으로 카페인은 많이 추출 되고 카테킨은 덜 추출 되는 것을 알 수 있었다. 그러므로 본 실험에서는 **최적 용매로 95% EtOH(v/v)을 선택**하였다.

## 2) 온도 영향 실험

건조된 녹차엽(두물차, 보성녹차시험장, 한국) 20g을 Cutting mill(IKL, IK2836000, KOR)로 분쇄한 후 particle size analyzer를 사용하여 평균입자크기가 543.7 $\mu$ m의 입자를 추출시료로 사용하였다. 상기에서 분쇄된 녹차 중 10g을 취하고 여기에 조용매를 4.6g 95% EtOH(v/v)/ 100g of CO<sub>2</sub> 의 양 만큼 골고루 혼합함으로써 녹차가 침지되도록 하였다.

에탄올에 침지된 녹차를 100ml의 초임계 추출용기에 넣고 추출압력 300bar, 추출온도 50, 60, 70, 80 $^{\circ}$ C, 이산화탄소 유속 8.5g/min 의 조건으로 초임계유체 추출을 40분간 수행하였다. 이때 초임계이산화 탄소의 Residence Time은 각각 50 $^{\circ}$ C일때 9.52min, 60 $^{\circ}$ C일때 9.1min, 70 $^{\circ}$ C일 때 8.34min, 80 $^{\circ}$ C일 때 8.13min이다. 다음으로, 상기 조용매 침지 및 초임계유체 추출단계를 동일한 조건으로 3회 반복 수행하였다. 마지막으로 상기 녹차엽 분말을 회수하고 105 $^{\circ}$ C의 건조오븐에서 12시간 동안 건조하여 수분 및 에탄올 성분을 제거한 후 앞서 설명한 방법으로 녹차 내 남아있는 성분들을 HPLC로 정량 분석하였다. 그 결과는 아래와 같다.

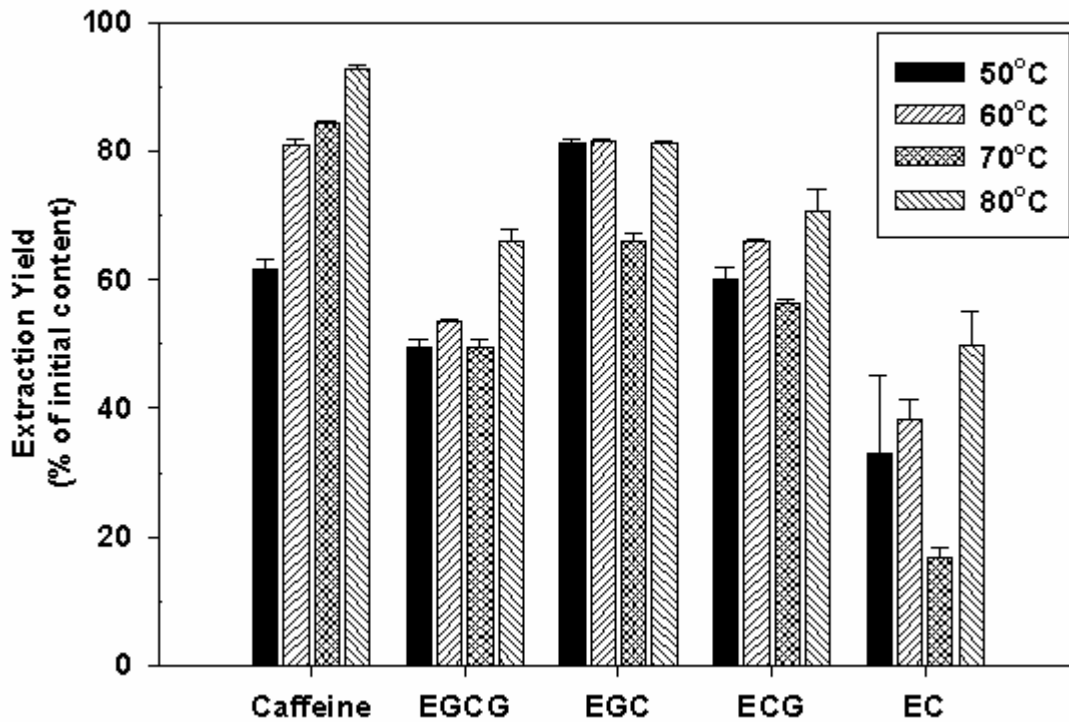


Fig. 2.2. Effects of extraction temperature on the extraction yields of green tea components in dry green tea (wt.% of their initial contents) extracted with supercritical CO<sub>2</sub> at 300 bar and at a CO<sub>2</sub> flow rate of 8.5 g/min for 120 min. The particle size of the green tea was 543.7 $\mu$ m, and ethanol (95%, v/v) was utilized as a cosolvent at a concentration of 4.6 g per 100 g of CO<sub>2</sub>. Control indicates the green tea before extraction.

Fig. 2.2를 보면 온도가 높을수록 카페인과 카테킨의 제거량이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 추출 온도가 높아 질수록 추출온도에 의한 Vapor Pressure Effect가 Density Effect보다 커서 카페인 추출이 더 잘되었던 것으로 사료된다. 그리고 가장 높은 온도인 80°C에서 카페인은 92% EGCG는 50%이상 제거되는 것으로 확인되었음.

본 실험에서는 앞의 실험을 통해 결정한 초임계이산화탄소의 최적 조용매 4.6g 95% EtOH(v/v)/ 100g of CO<sub>2</sub>를 바탕으로 온도에 의한 초임계이산화탄소의 카페인 및 카테킨 추출 영향을 비교 실험하였다. 그 결과 위의 그래프를 보면 알 수 있듯이 온도가 높을수록 카페인이 많이 추출되었음을 알 수 있다. 그 이유는 초임계이산화탄소 영향중 Density Effect와 Vapor Pressure Effect가 있는데 Density Effect의 경우 온도가 일정할 때 압력이 올라갈수록 밀도는 높아지고 반대로 압력이 일정할 때 온도가 낮아질수록 밀도가 높아지는 초임계이산화탄소의 특징에 의한 영향이고 Vapor Pressure Effect의 경우는 같은 압력일 때 온도에 의한 밀도차이보다 증기압에 의해 solid가 초임계유체상에 더 많이 존재하려는 경향이 밀도에 의한 영향보다 더 큰 특징을 말하는 것이다. 위의 실험 같은 경우는 Vapor Pressure Effect가 Density Effect보다 커서 80°C일때 가장 카페인이 많이 추출된 것을 알 수 있다. 그러나 본 실험에서는 사용한 초임계유체추출장치 및 고압용기의 최대 사용온도가 80°C이기 때문에 70°C를 최적 온도로 설정하고 다음 실험을 수행하였다.

### 3) 압력 영향 실험

건조된 녹차엽(두물차, 보성녹차시험장, 한국) 20g을 Cutting mill(IKL, IK2836000, KOR)로 분쇄한 후 particle size analyzer를 사용하여 평균입자크기가 543.7 $\mu$ m 입자를 추출시료로 사용하였다. 상기에서 분쇄된 녹차 중 10g을 취하고 여기에 조용매로서 4.6g 95% EtOH(v/v)/ 100g of CO<sub>2</sub> 를 혼합 함으로써 녹차가 침지되도록 하였다. 에탄올에 침지된 녹차를 100ml의 초임계 추출용기에 넣고 추출압력 150, 200, 250, 300bar, 추출온도 70 $^{\circ}$ C, 이산화탄소 유속 8.5g/min 의 조건으로 초임계유체 추출을 40분간 수행하였다. 이때 초임계이산화 탄소의 Residence Time은 각각 150 bar 일 때 5.67min, 200 bar일 때 7.28min, 250 bar일 때 8.04min, 300 bar일 때 8.34 min이다. 다음으로, 상기 조용매 침지 및 초임계유체 추출단계를 동일한 조건으로 3회 반복 수행하였다. 마지막으로 상기 녹차엽 분말을 회수하고 105 $^{\circ}$ C의 건조오븐에서 12시간 동안 건조하여 수분 및 에탄올 성분을 제거한 후 앞서 설명한 방법으로 녹차내 남아있는 성분들을 HPLC로 정량 분석함. 그 결과는 아래와 같다.

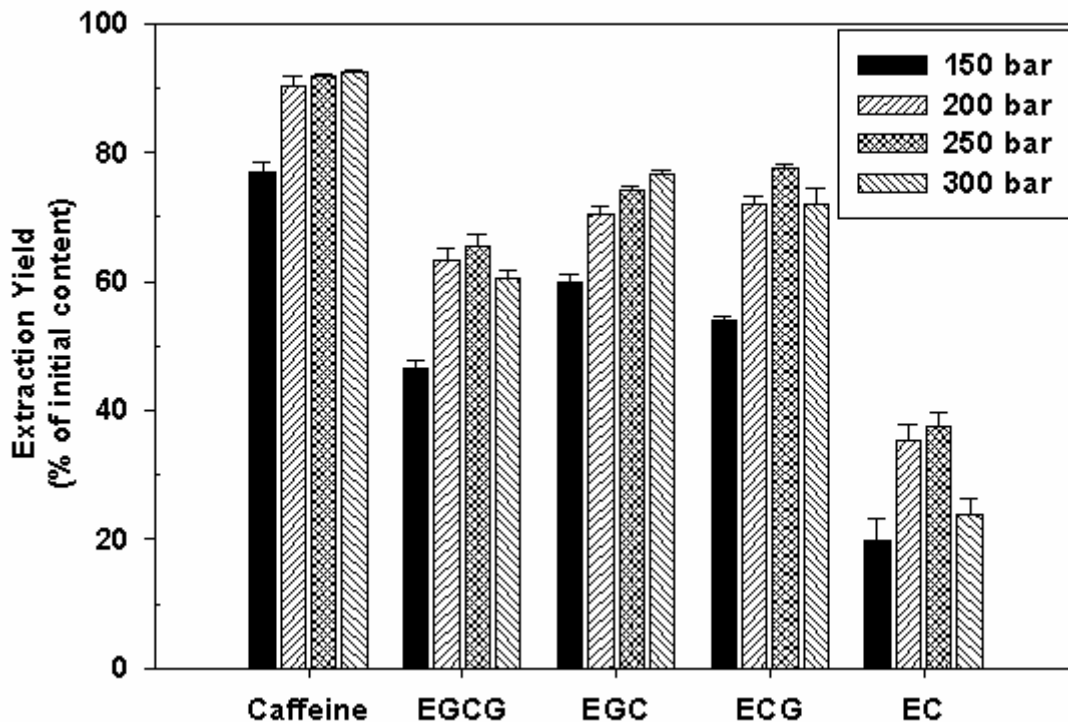


Fig. 2.3. Effects of extraction pressure on the extraction yields of green tea components in dry green tea (wt.% of their initial contents) extracted with supercritical CO<sub>2</sub> at 70 $^{\circ}$ C and at a CO<sub>2</sub> flow rate of 8.5 g/min for 120 min. The particle size of the green tea was 543.7 $\mu$ m, and ethanol (95%, v/v) was used as a cosolvent at a concentration of 4.6 g per 100 g of CO<sub>2</sub>. Control indicates the green tea before extraction.

Fig. 2.3을 보면 압력이 증가 할 수 록 카페인과 카테킨의 제거양이 증가 하는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 추출압력이 높아 질 수 록 추출압력에 의한 Density Effect가 Vapor Pressure Effect보다 커

서 카페인 추출이 더 잘 되었던 것으로 사료된다. Fig. 2.3을 보면 300 bar 일때 카페인이 92%, EGCG 가 60% 이상 제거된 것을 확인 할 수 있었다.

본 실험에서는 앞의 실험을 통해 결정한 최적온도 70℃를 바탕으로 압력에 의한 초임계이산화탄소의 카페인 및 카테킨 추출 영향을 비교 실험하였다. 그 결과 위의 그래프를 보면 알 수 있듯이 300 bar일 때 카페인이 가장 많이 추출되었음은 것을 알 수 있다. 그 이유는 앞선 온도영향 실험과는 반대로, 동일한 온도일때 압력이 높을수록 초임계이산화탄소의 밀도는 증가한다. 그러므로 Density Effect 가 Vapor Pressure Effect보다 더 커서 압력이 높을 수 록 카페인이 더 많이 추출 되는걸 알 수 있다. 이러한 결과를 바탕으로 하여 **최적 압력을 300 bar**로 정하고 다음 실험을 수행하였다.

#### 4) CO<sub>2</sub> 유속 영향 실험

건조된 녹차엽(두물차, 보성녹차시험장, 한국) 20g을 Cutting mill(IKL, IK2836000, KOR)로 분쇄 한 후 particle size analyzer를 사용하여 평균입자크기가 543.7 $\mu$ m 입자를 추출시료로 사용하였다. 상기에서 분쇄된 녹차 중 10g을 취하고 여기에 조용매로서 4.6g 95% EtOH(v/v)/ 100g of CO<sub>2</sub> 로 골고루 혼합함으로써 녹차가 침지되도록 하였다. 에탄올에 침지된 녹차를 100ml의 초임계 추출용 기에 넣고 추출압력 300bar, 추출온도 70℃, 이산화탄소 유속 5.5, 8.5, 11.5, 14.5 g/min 의 조건으로 초임계유체 추출을 40분간 수행하였다. 이때 초임계이산화 탄소의 Residence Time은 각각 5.5g/min 일때 12.90min, 8.5g/min 일때 8.34min, 11.5 g/min 일때 6.17min, 14.5 g/min 일때 4.89min 이다. 다음으로, 상기 조용매 침지 및 초임계유체 추출단계를 동일한 조건으로 3회 반복 수행하였다. 마지막으로 상기 녹차엽 분말을 회수하고 105℃의 건조오븐에서 12시간 동안 건조하여 수분 및 에탄올 성분을 제거한 후 앞서 설명한 방법으로 녹차 내 남아있는 성분들을 HPLC로 정량분석 하였으며 그 결과는 아래와 같다.

Table 2.3 Effect of CO<sub>2</sub> flow rate on theremoval of caffeine from green tea leaves by using SC-CO<sub>2</sub>

CO <sub>2</sub> flow rate(g/min)	Extraction conditions		Component removal yield based on initial content (% , w/w)						Extraction efficiency (mg component/ kg CO <sub>2</sub> used)			
	Residence time of CO <sub>2</sub> (min)		Caffeine	EGCG	EGC	ECG	EC	Caffeine	EGCG	EGC	ECG	EC
5.5	12.90		80.1	46.0	67.7	46.0	8.9	475.1	958.4	791.9	179.8	7.7
8.5	8.34		92.8	64.2	78.2	72.5	24.0	356.4	865.0	591.5	183.4	13.4
11.5	6.17		95.6	73.6	80.8	79.0	38.1	271.3	732.8	451.7	147.7	15.7
14.5	4.89		93.2	77.0	86.5	80.9	51.2	209.8	608.1	383.6	119.9	16.8

<sup>a</sup> Extraction was conducted with green tea leaves with a mean particle size of 543.7 $\mu$ m at 300 bar and 70°C and at a CO<sub>2</sub> flow rate of 5.5, 8.5, 11.5, and 14.5 g/min for 120 min, where 95% (v/v) ethanol was used as a cosolvent at 4.6 g per 100 g of CO<sub>2</sub>.

Table 2.3을 보면 CO<sub>2</sub> 유속이 11.5 g/min 으로 초임계처리 했을 때 14.5 g/min 으로 처리했을 때 보다 카페인이 더 많이 제거 된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 사용된 CO<sub>2</sub>의 양에 대한 녹차성분의 추출량으로 나누어 계산하였을 때, 대부분의 결과에서 CO<sub>2</sub>의 유속이 빠를수록 단위 CO<sub>2</sub> 사용량 대비 녹차성분의 추출량의 비율이 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이는 녹차시료 입자주위의 External mass transfer resistance보다 녹차입자 내 Internal mass transfer resistance가 더 크기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 CO<sub>2</sub>의 유속을 빨리하는 것은 표에서 보는 바와 같이 절대량의 녹차성분 및 카페인의 추출에는 유리하나 CO<sub>2</sub>의 사용량 및 이용효율을 고려하면 유속을 낮추는 것이 유리하다고 할 수 있다. 본 실험에서는 카페인의 절대량의 추출속도가 가장 빠른 유속인 **11.5 g/min을 최적 조건**으로 선정하였다.

본 실험에서는 앞의 실험을 통해 결정한 최적압력 300 bar를 바탕으로 CO<sub>2</sub>유속에 의한 초임계이산화탄소의 카페인 및 카테킨 추출 영향을 비교 실험하였다. 그 결과 위의 표를 보면 알 수 있듯이 CO<sub>2</sub>유속이 11.5 g/min 일 때 14.5 g/min 보다 카페인이 더 많이 추출되었음은 것을 알 수 있다. 만약이 External mass transfer resistance가 Internal mass transfer resistance보다 더 크다면 CO<sub>2</sub>유속이 빠를수록 Residence time의 영향이나 Internal mass transfer resistance보다 입자의 External mass transfer 의 영향을 더 크게 받기 때문에 CO<sub>2</sub>의 유속을 빠르게 해주면 증가되는 비율만큼 보다 더 많이 용질이 추출이 되어야 하나 녹차의 경우는 Internal mass transfer resistance의 영향이 커서 CO<sub>2</sub>유속을 빠르게 하여도 사용하는 CO<sub>2</sub>량 만큼의 카페인의 추출효율을 얻지 못하는 것으로 확인하였다. 그러므로 CO<sub>2</sub>유속이 14.5 g/min 일 때 녹차입자 내에 있는 카페인이 Internal mass transfer resistance를 더 크게 받아서 유속이 11.5 g/min 일때 보다 카페인 추출이 덜 되었던 것으로 생각된다.

## 5) 녹차 입자크기 영향 실험

건조된 녹차엽(두물차, 보성녹차시험장, 한국) 20g을 Cutting mill(IKL, IK2836000, KOR)로 분쇄한 후 particle size analyzer를 사용하여 평균입자 크기가 236.5, 543.7 $\mu$ m 인 녹차와 갈지않은 녹차 5.5-17.4 mm를 추출시료로 사용하였다. 상기에서 분쇄된 녹차 중 10g을 취하고 여기에 조용매로서 4.6g 95% EtOH(v/v)/ 100g of CO<sub>2</sub> 로 골고루 혼합함으로써 녹차가 침지되도록 하였다. 에탄올에 침지된 녹차를 100ml의 초임계 추출용기에 넣고 추출압력 300bar, 추출온도 70 $^{\circ}$ C, 이산화탄소 유속 11.5g/min 의 조건으로 초임계유체 추출을 40분간 수행하였다. 이때 초임계이산화탄소의 Residence Time은 각각 236.5 $\mu$ m일때 6.12min, 543.7 $\mu$ m 일때 6.17min, 5.5-17.4 mm일때 6.24min 이다. 다음으로, 상기 조용매 침지 및 초임계유체 추출단계를 동일한 조건으로 3회 반복 수행하였다. 마지막으로 상기 녹차엽 분말을 회수하고 105 $^{\circ}$ C의 건조오븐에서 12시간 동안 건조하여 수분 및 에탄올 성분을 제거한 후 앞서 설명한 방법으로 녹차내 남아있는 성분들을 HPLC로 정량분석함. 그 결과는 아래와 같다.

Table 2. 4 Effect of the particle size of green tea leaves on the removal of caffeine from green tea leaves by using SC-CO<sub>2</sub>

Particle size	Component removal yield based on initial content (% , w/w)				
	Caffeine	EGCG	EGC	ECG	EC
236.5 $\mu$ m	97.3	70.8	81.3	76.6	47.8
543.7 $\mu$ m	95.6	73.6	80.8	79.0	38.1
5.5-17.4 mm	80.6	47.5	64.2	50.9	31.7

<sup>a</sup> Extraction was conducted with green tea leaves with a particle size of 236.5 $\mu$ m, 543.7 $\mu$ m, and 5.5-17.4 mm at 300 bar and 70°C and at a CO<sub>2</sub> flow rate of 11.5 g/min for 120 min, where 95% (v/v) ethanol was used as a cosolvent at 4.6 g per 100 g of CO<sub>2</sub>.

위의 표를 보면 녹차의 입자가 작을 수 록 큰 입자에 비해 카페인 더 많이 제거 되는 것을 알 수 있었다. 이는 입자크기가 작을 수 록 녹차 입자와 CO<sub>2</sub>와의 접촉 면적도 넓어지고 녹차입자의 Internal mass transfer resistance도 작아져 카페인 추출이 더 잘되는 것으로 사료된다. 표를 보면 녹차입자 크기가 236.5 $\mu$ m 이하 일때 카페인의 제거량이 97.3%로 같지 않은 녹차(5.5~17.4mm)의 카페인 제거량 80.6%보다 높게 나타났다.

본 실험에서는 앞의 실험을 통해 결정한 최적 CO<sub>2</sub>유속 11.5 g/min를 바탕으로 녹차입자크기에 의한 초임계이산화탄소의 카페인 및 카테킨 추출 영향을 비교 실험하였다. 유속, 압력, 온도가 동일 할 때 입자크기가 작아지면 공극률이 적어져 초임계 이산화탄소의 Residence time이 짧아지기 때문에 추출되는 카페인 양이 적어질 수 있다. 반면 입자 크기가 작아짐에 따라 CO<sub>2</sub>와의 접촉면적도 넓어짐과 동시에 입자 내부로부터 입자표면까지의 용질의 확산거리가 감소하여 Internal mass transfer resistance를 줄이므로 이는 더 많은 양의 카페인을 추출할 수 있다. 위 실험 결과에 따르면 입자크기가 작을수록 더 많은 양의 카페인 추출되었고, 그 결과 236.5 $\mu$ m일 때 카페인 양이 가장 많이 추출되는 것을 알 수 있다. 결국 유속에 따른 결과와 마찬가지로 입자크기에 따른 추출량 또한 Residence time의 영향보다는 Internal mass transfer resistance의 영향이 큰 것으로 사료된다. 따라서 **최적 녹차입자크기를 236.5 $\mu$ m로** 정하고 다음 실험을 수행하였다.



## 6) 추출 공정변수의 최적화 - 최대의 카페인 추출가능 최적 조건 확립

건조된 녹차엽(두물차, 보성녹차시험장, 한국) 20g을 Cutting mill(IKL, IK2836000, KOR)로 분쇄한 후 particle size analyzer를 사용하여 평균입자가  $236.5\mu\text{m}$  인 입자를 추출시료로 사용하였다. 상기에서 분쇄된 녹차 중 10g을 취하고 여기에 조용매로서 4.6g 95% EtOH(v/v)/ 100g of CO<sub>2</sub> 로 골고루 혼합함으로써 녹차가 침지되도록 하였다. 에탄올에 침지된 녹차를 100ml의 초임계 추출용기에 넣고 추출압력 300bar, 추출온도 70°C, 이산화탄소 유속 11.5g/min 의 조건으로 초임계유체 추출을 40분간 수행하였다. 이때 초임계이산화 탄소의 Residence Time은 6.12 min이다. 다음으로, 상기 조용매 침지 및 초임계유체 추출단계를 동일한 조건으로 5회 반복 수행하였다. 마지막으로 상기 녹차엽 분말을 회수하고 105°C의 건조오븐에서 12시간 동안 건조하여 수분 및 에탄올 성분을 제거한 후 앞서 설명드린 방법으로 녹차내 남아있는 성분들을 HPLC로 정량 분석하였다. 그 결과는 아래와 같다.

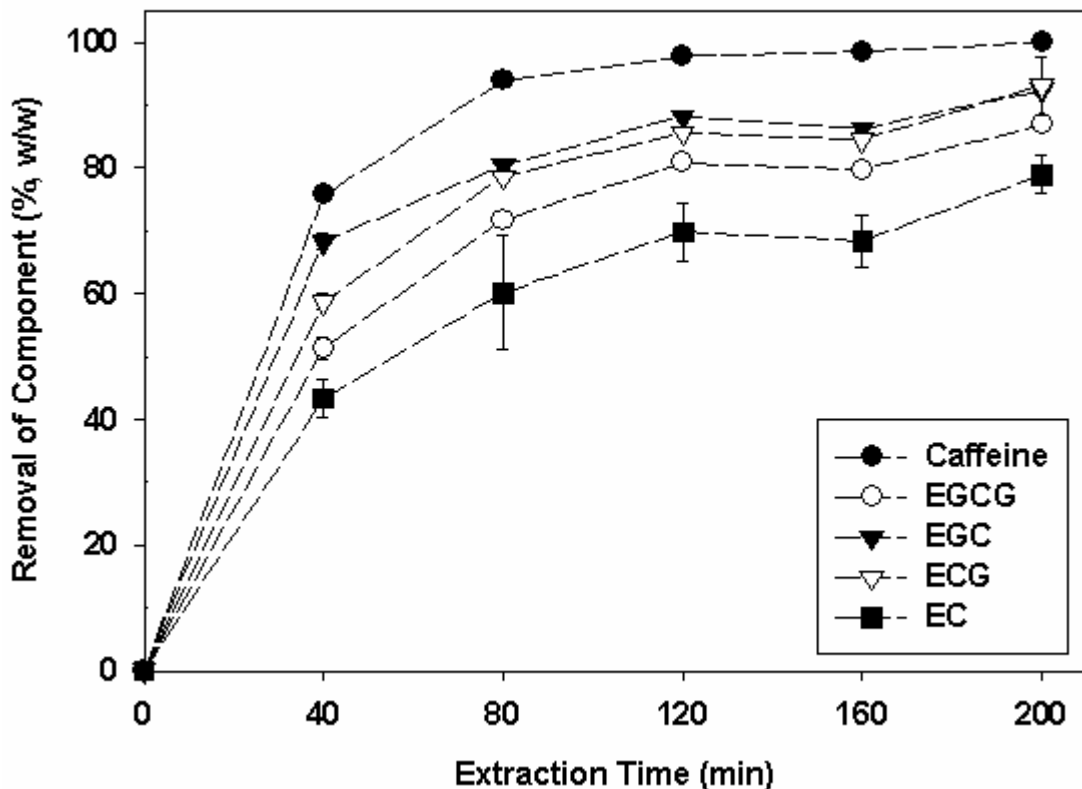


Fig. 2.4. Removal yield of caffeine and catechins from green tea leaves (% of their initial contents) with time on a laboratory scale (10 g of dry green tea leaves in the 100 mL internal volume of extraction vessel), where the SC-CO<sub>2</sub> extraction conditions were a mean particle size of  $236.5\mu\text{m}$  for the ground green tea, 300 bar, 70°C, a CO<sub>2</sub> flow rate of 11.5 g/min, and 4.6 g of 95% (v/v)ethanol as a cosolvent per 100 g of CO<sub>2</sub>.

Fig. 2.4를 보면 상기 조건으로 추출시간을 200분으로 처리 했을 때 카페인이 완전히 제거되고 EGCG는 85%정도 추출되는 것을 확인할 수 있었다.

본 실험은 앞서 수행했던 조용매, 온도, 압력, CO<sub>2</sub> 유속, 입자크기의 영향실험의 결과 중에서 가장 카페인을 많이 제거하는 조건을 바탕으로 추출시간에 따라 카페인이 최대로 추출 될때 까지 실험을 반복 수행하였다. 그 결과 200분처리 했을 때 카페인이 완전히 제거되는 것을 알 수 있었다. 그러나 비록 짧은 시간에 카페인은 완전히 제거 되었으나 유용한 카테킨 성분인 EGCG도 85%나 제거 되는 단점이 있어 물질전달적 요소인 입자크기와 CO<sub>2</sub> 유속 조건을 조금 달리 하여 카페인은 많이 제거하면서 카테킨 성분은 최소한으로 제거되는 조건을 정해서 계속 실험을 수행하였다.

#### 7) 추출공정변수의 최적화 - 최소의 catechin 추출가능 최적 조건 확립

건조된 녹차엽(두물차, 보성녹차시험장, 한국) 중 갈지않은 녹차(5.5~17.4mm) 10g을 추출시료로 사용하였음. 여기에 조용매로서 4.6g 95% EtOH(v/v)/ 100g of CO<sub>2</sub> 을 골고루 혼합함으로써 녹차가 침지되도록 하였다. 에탄올에 침지된 녹차를 100ml의 초임계 추출용기에 넣고 추출압력 300bar, 추출온도 70℃, 이산화탄소 유속 5.5g/min의 조건으로 하여 EGCG가 최대한 보존되면서 카페인을 비교적 신속하게 제거할 수 있는 조건으로 설정한 후 초임계유체 추출을 40분간 수행하였다. 이때 초임계이산화 탄소의 Residence Time은 13.04 min이다. 다음으로, 상기 조용매 침지 및 초임계유체 추출단계를 동일한 조건으로 12회 반복 수행하였다. 마지막으로 상기 녹차엽 분말을 회수하고 105℃의 건조오븐에서 12시간 동안 건조하여 수분 및 에탄올 성분을 제거한 후 앞서 설명한 방법으로 녹차 내 남아있는 성분들을 HPLC로 분석하였으며 그 결과는 아래와 같다.

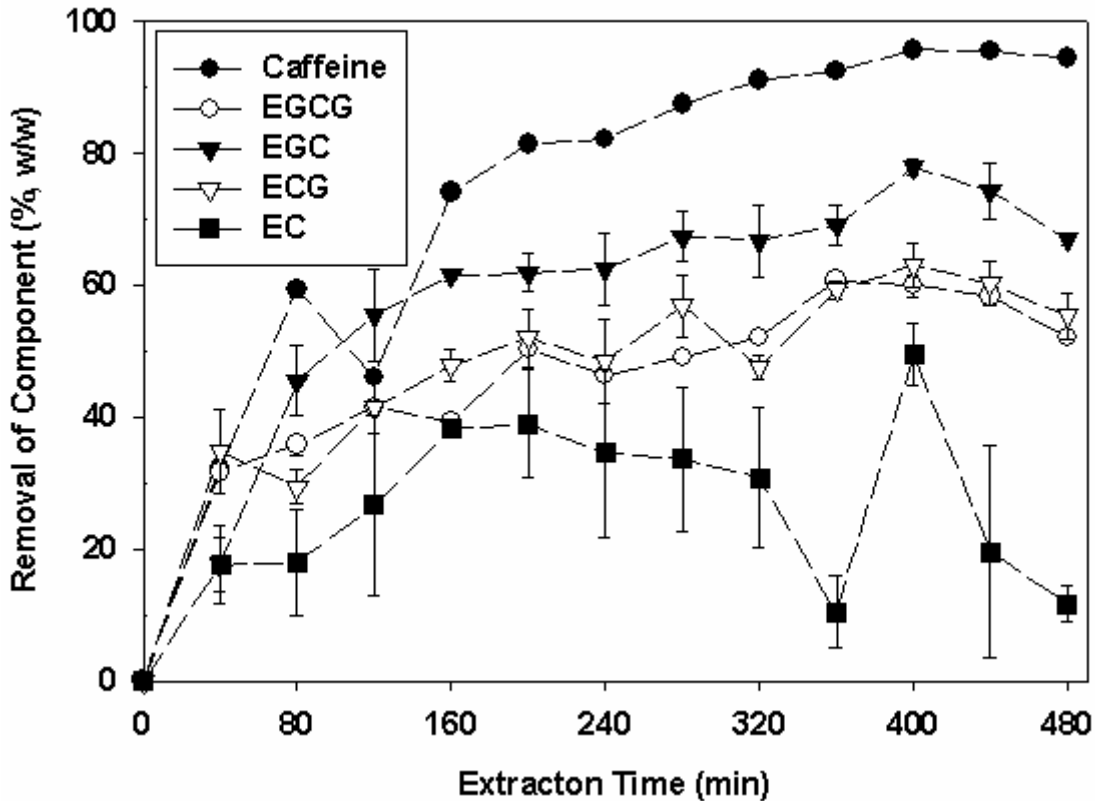


Fig. 2.5. Removal yield of caffeine and catechins from green tea leaves (% of their initial contents) with time on a laboratory scale (10 g of dry green tea leaves in the 100 mL internal volume of extraction vessel), where the SC-CO<sub>2</sub> extraction conditions were a green tea particle size of 5.5–17.4 mm without grinding, 300 bar, 70°C, a CO<sub>2</sub> flow rate of 5.5 g/min, and 4.6 g of 95% (v/v) ethanol as a cosolvent per 100 g of CO<sub>2</sub>.

Fig. 2.5을 보면 상기 조건으로 480분 동안 추출하였을 때 카페인 95%가 제거되고 EGCG는 50%정도 손실되는 것을 확인할 수 있었다.

본 실험은 앞서 수행했던 조용매, 온도, 압력, CO<sub>2</sub>유속, 입자크기의 영향실험의 결과 중에서 가장 카페인을 많이 제거하는 조건 중 EGCG가 적게 제거된 조건인 CO<sub>2</sub> 유속 5.5 g/min, 갈지않은 녹차 (5.5~17.4mm) 만 달리하여 시간을 늘여서 카페인이 최대로 추출될 때 까지 실험을 반복 수행 하였다.. 그 결과 480분 처리 했을 때 카페인 95% 제거되면서 EGCG는 50% 잔존하는 것을 알 수 있다. 그 결과 이 조건을 카페인 많이 제거하면서 카테킨 성분은 최소한으로 제거되는 조건으로 최종적으로 정하게 되었다.



Fig. 2.6. Comparison of untreated (left) with treated(right) by SC-CO<sub>2</sub> at flow rates 5.5 g/min, 300 bar, and 70 °C for 480 min. Particle size of green tea was 5,500 ~ 17,400 μm (no grinding). Extraction cosolvent was 5.8% of g EtOH per g CO<sub>2</sub>.

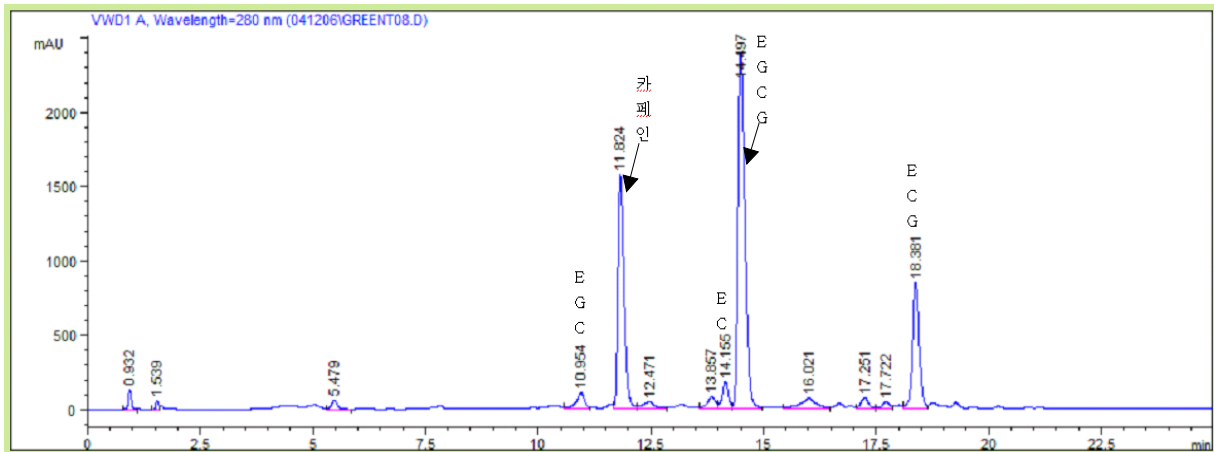


Fig. 2.7. HPLC chromatogram of green tea before supercritical CO<sub>2</sub> extraction.

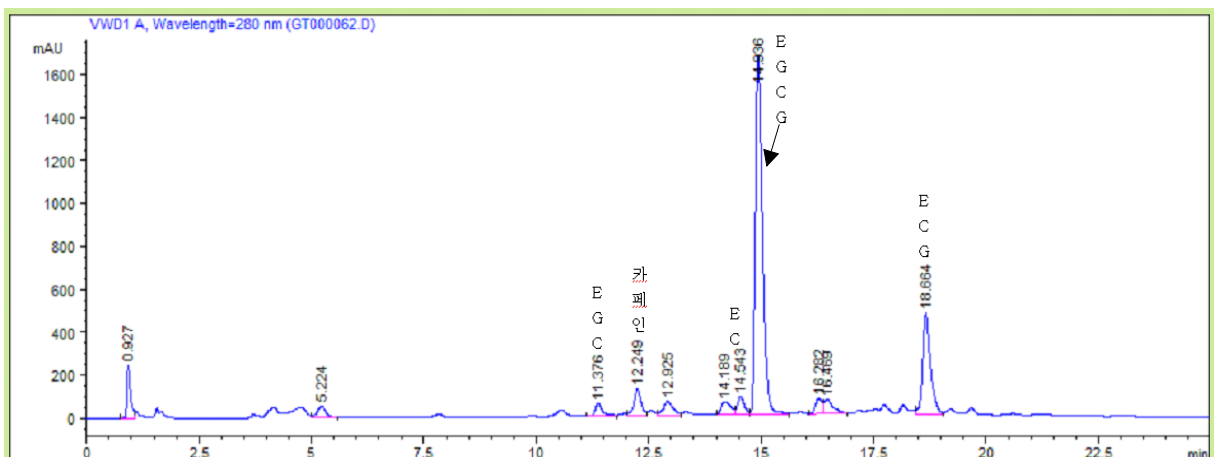


Fig. 2.8. HPLC chromatogram of green tea decaffeinated by SC-CO<sub>2</sub> at flow rates 5.5 g/min, 300 bar, and 70°C for 480 min. Particle size of green tea was 5,5~17,4mm (no grinding). Extraction cosolvent was 4.6 g of 95% (v/v) ethanol as a cosolvent per 100 g of CO<sub>2</sub>.

## 8) Pilot plant에서의 탈카페인 녹차 대량처리

선행실험에서 수행한 초임계이산화탄소를 이용하여 카페인을 많이 제거하면서 카테킨 성분은 최소한으로 제거되는 조건으로 탈카페인 녹차를 대량 처리하였다. 탈카페인녹차의 대량처리를 위해 우리는 충남 아산에 소재하고 있는 (주)타렉스에 설치되어 있는 과일롯플랜트 스케일의 초임계 이산화탄소 추출장치(고압용기의 용량 12 리터 2개, Thar Technologies, USA)를 이용하여 세부 및 협동 연구팀 탈카페인 녹차 시료공급을 위함과 동시에 랩스케일에서 확립한 탈카페인녹차 제조 공정이 과일롯 스케일에서도 적용이 가능하고 산업적으로 적용하여 제품화가 가능한지 확인하기 위해서 대량의 시료를 추출하였다.

실험 방법은 건조된 녹차엽(두물차, 보성녹차시험장, 한국) 평균입자크기  $543.7\mu\text{m}$ 의 녹차분말 1.88kg을 시료로 사용하였다. 여기에 조용매로서 에탄올(95%, v/v)을 본 용매인 이산화탄소에 대한 비율을 7.0kg 95% EtOH(v/v)/ 100kg of CO<sub>2</sub>로 동일하게 가하여 골고루 혼합함으로써 녹차가 침지되도록 하였다. 에탄올에 침지된 녹차를 12L의 초임계 추출용기에 넣고 추출압력 300bar, 추출온도 70°C, 이산화탄소 유속 1.25 kg/min 의 조건으로 초임계유체 추출을 51분간 수행하였다. 이때 초임계이산화 탄소의 Residence Time은 8.40 min 이다. 다음으로, 상기 조용매 침지 및 초임계유체 추출단계를 동일한 조건으로 4, 9회, 14회 반복 수행하였다. 마지막으로 상기 녹차엽 분말을 회수하고 105°C의 건조오븐에서 12시간 동안 건조하여 수분 및 에탄올 성분을 제거한 후 앞서 설명한 방법으로 녹차 내 남아있는 성분들을 HPLC로 분석하였다.



Fig. 2.9. Pilot plant-scale SC-CO<sub>2</sub> extraction system at Tharex (Asan, Korea).

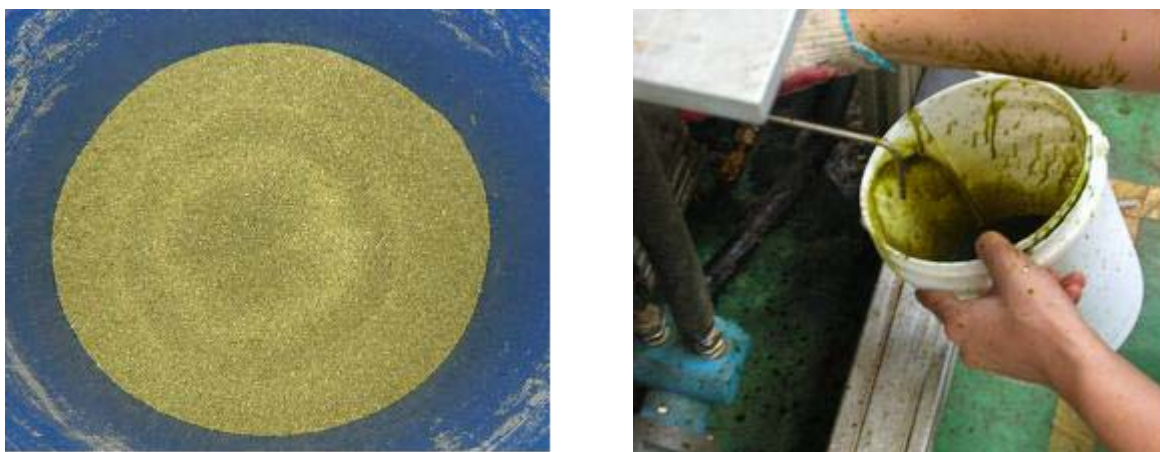


Fig. 2.10. Extreated green tea (left) and its extract (right) at the pilot plant-scale SC-CO<sub>2</sub> extraction system at Tharex (Asan, Korea).

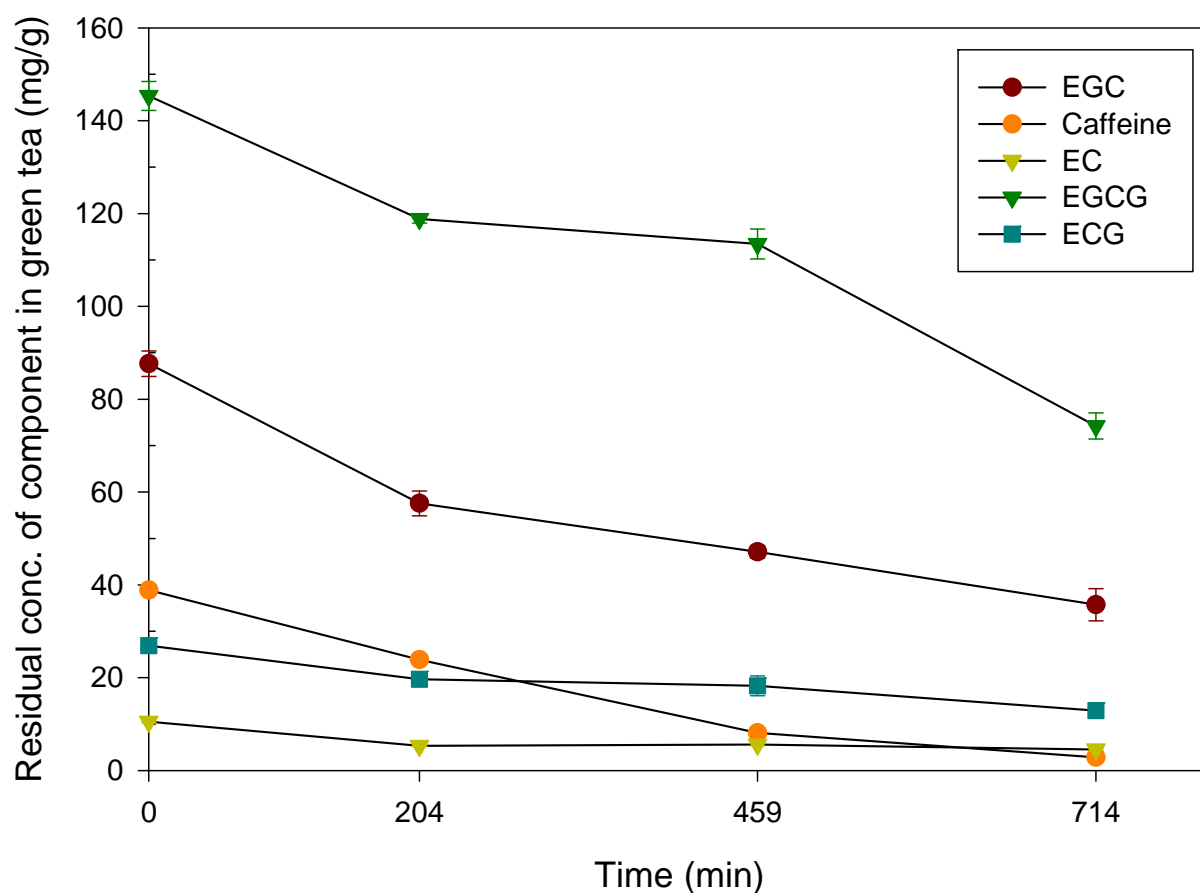


Fig. 2.11. The residual concentration of green tea components in green tea (mg/g) treated by SC-CO<sub>2</sub> at flow rates 1.25 kg/min, 300 bar, and 70 °C for 714 min in pilot plant. Particle size of green tea was 543.7 $\mu$ m. Extraction cosolvent was 4.6g 95% EtOH(v/v)/ 100g of CO<sub>2</sub> at the pilot plant-scale SC-CO<sub>2</sub> extraction system at Tharex (Asan, Korea).

Fig. 2.11.를 보면 처리시간을 증가시킴에 따라 모든 성분의 함량이 감소하였고 표2.5를 보면 랩스케일과 비교 했을 때 굉장히 많은 양의 녹차와 에탄올 및 이산화탄소가 사용되었지만 비슷한 결과를 나타냄을 확인하였고 랩스케일에서의 실험결과를 바탕으로 파일럿 스케일에서도 적용이 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

**Table 2.5** Comparison of laboratory- and pilot-scale extraction conditions and results necessary for achieving removal of over 90% of caffeine

Sample size	Scale	Extraction conditions						Extraction yield		
		Internal volume of extraction vessel	Temperature (°C)	Pressure (bar)	CO <sub>2</sub> flow rate (g/min)	Residence time (min)	Particle size (µm)	Extraction Time (min)	Caffeine (% w/w)	Caffeine (mg caffeine/kg CO <sub>2</sub> used)
10 g	100 mL		70	300	11.5	6.12	236.5	80	93.89±0.94	399.67±0.03
10 g	100 mL		70	300	5.5	13.04	5500-17400	320	90.98±0.65	202.45±0.28
1.88 kg	12 L		70	300	1250	8.40	543.7	714	93.35±0.03	77.00±0.14



### 제 3 절 Ethyl acetate를 이용한 녹차엽의 선택적 탈카페인 추출조건 확립

#### 1. Control 시료분석

본 실험에 사용된 녹차는 2006년 9월경에 (주) 녹차원에서 제공받은 녹차로 실험을 수행하였다. 녹차내의 카페인 및 카페킨의 정량분석은 1절에서 최적화한 실험방법과 동일한 방법으로 분석하였고 그 결과는 아래 표와 같다.

Table 3.1 Composition of green tea used in this study

Component	Caffeine	EGGC	EGC	EC	ECG
mg / g (Dry weight)	23.35 ± 0.72	81.69 ± 1.84	55.25 ± 0.33	2.75 ± 0.18	13.78 ± 0.39

#### 2. 공동용매 사용에 따른 영향 분석

본 실험에서는 Ethyl acetate를 이용한 녹차엽의 선택적 탈카페인 추출조건을 확립하기 위해 공동용매로 95%(v/v) 에탄올과 물을 사용하여 그 농도비를 달리 하였을 때 녹차내의 카페인 추출량이 어떠한지를 알아보았다.

Ethyl acetate 에탄올 수용액은 일반적으로 커피의 탈카페인공정에 쓰이는 용매이다. 본 연구에서도 Ethyl acetate 에탄올 수용액을 용매로 이용하기 위한 목적으로 이 용매에 대한 평형상태에서의 용해도를 측정하였다. Merk Index에 따르면 ethyl acetate의 평형용해도가 물에는 3.3%(v/v), 에탄올에는 9.0%(v/v)의 용해도를 갖기 때문에 본 실험에서는 단일상(single phase)의 용매를 만들기 위하여 이들 용해도 보다 낮은 ethyl acetate 수용액인 1, 2, 3% ethyl acetate in water와 3, 6, 9% ethyl acetate in 95%(v/v) EtOH 을 용매로 만들어 실험에 사용하였다.

실험방법은 평균입자크기 236.5 $\mu$ m의 녹차 1g 에 각각 농도를 달리한 용매 20ml을 넣고 shaking water bath에서 35 $^{\circ}$ C, 60분간 100 rpm으로 추출하였다. 마지막으로 상기 녹차엽 분말을 회수하고 105 $^{\circ}$ C의 건조오븐에서 12시간 동안 건조하여 수분 및 용매를 제거한 후 앞서 설명한 방법으로 녹차 내 남아있는 성분들을 HPLC로 분석하였다. 그 결과는 아래 그래프와 같다.

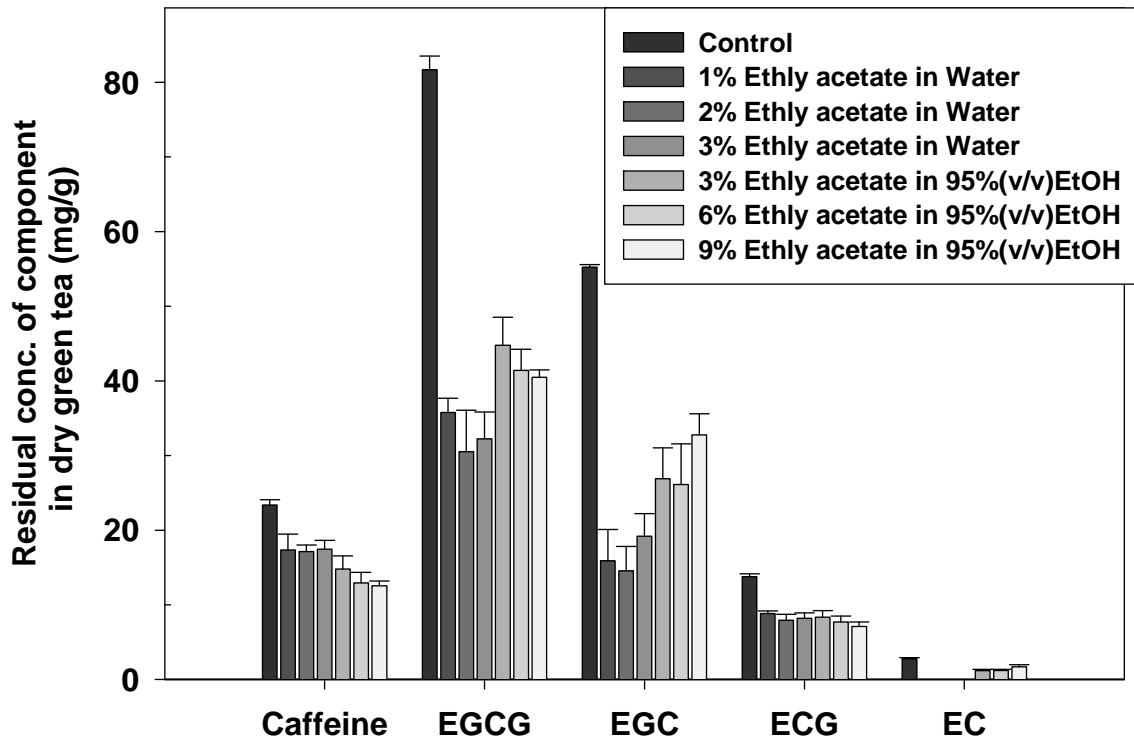


Fig. 3.1 Effects of extraction solvents concentration on the extraction yields of green tea components in dry green tea. Control indicates the green tea before extraction.

위의 Fig. 3.1을 보면 9% Ethyl acetate in 95%(v/v) EtOH 수용액을 사용했을 때 카페인 가장 많이 추출된 것을 알 수 있다. 왜냐하면 에탄올이 물보다 비극성이 크고 ethyl acetate 농도가 높을수록 비극성도가 크기 때문에 비교적 비극성 물질에 잘 녹는 카페인이 추출이 많이 된 것으로 생각된다. 그래서 최적용매로 9% Ethyl acetate in 95%(v/v) EtOH 수용액을 결정하였다.

### 3. 추출온도 영향

앞선 실험에서 최적용매로 정해진 9% Ethyl acetate in 95% EtOH 수용액에 앞선 실험 조건에서 다른 조건들은 동일시 하고 온도만을 35, 50, 65℃ 로 달리 하여 추출온도에 따른 카페인 추출량을 보았다. 마지막으로 상기 녹차엽 분말을 회수하고 105℃의 건조오븐에서 12시간 동안 건조하여 수분 및 용매를 제거한 후 앞서 설명한 방법으로 녹차 내 남아있는 성분들을 HPLC로 분석하였다. 그 결과 35℃ 일때 카페인이 가장 잘 추출되는 결과를 얻었다.

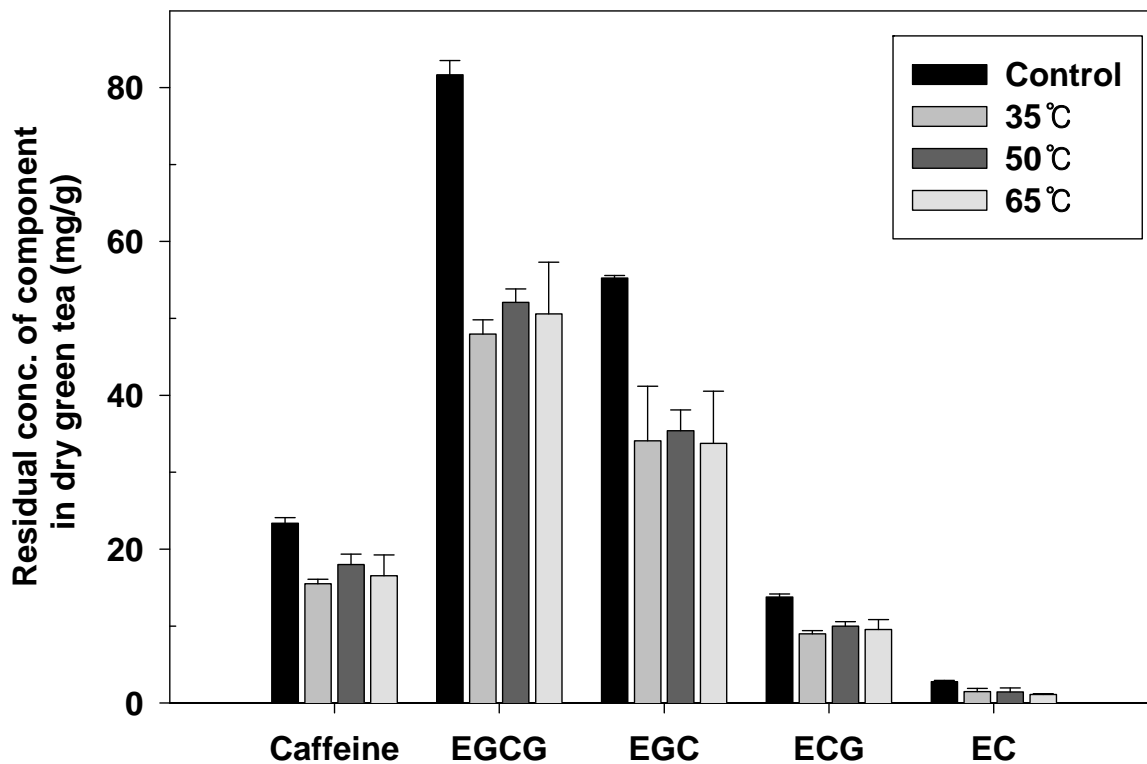


Fig. 3.2. Effects of extraction temperature on the extraction yields of green tea components in dry green tea. Control indicates the green tea before extraction.

#### 4. 추출시간 영향

앞선 실험에서 최적용매로 정해진 9% Ethyl acetate in 95% EtOH 수용액과 최적온도 조건인 35°C에 앞선 실험 조건에서 다른 조건들은 동일시 하고 추출시간만을 15, 60, 90, 120 min 으로 달리 하여 추출시간에 따른 카페인 추출량을 보았다. 마지막으로 상기 녹차엽 분말을 회수하고 105°C의 건조오븐에서 12시간 동안 건조하여 수분 및 용매를 제거한 후 앞서 설명한 방법으로 녹차 내 남아있는 성분들을 HPLC로 분석하였다.

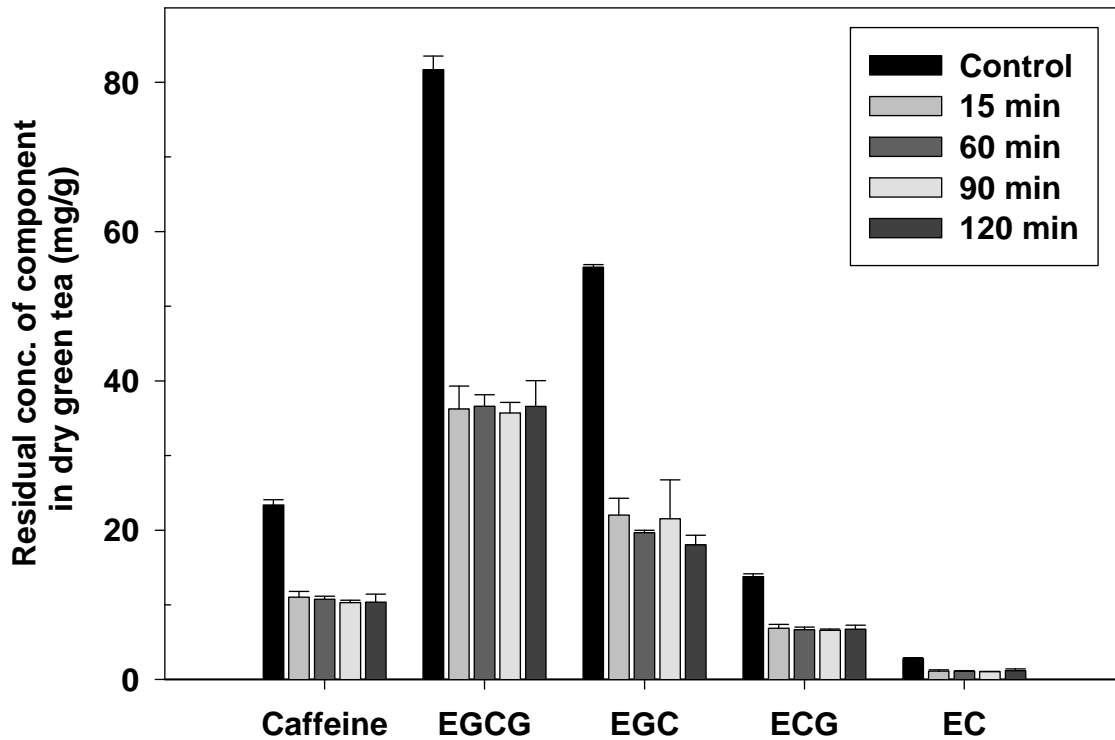


Fig. 3.3 Effects of extraction time on the extraction yields of green tea components in dry green tea. Control indicates the green tea before extraction.

그 결과 추출시간에 따른 추출량의 변화가 별로 유의적으로 나타나지는 않으나 90 min 간 추출했을 때 카페인 추출되는 절대적이 양이 가장 많은 걸로 확인되었다.

### 5. Solid/Solvent Ratio 영향

녹차와 추출용매의 비율을 달리했을 때의 카페인 추출효율을 알아보기 위해 추출용매를 20ml로 고정하고 녹차의 양을 0.5, 1, 2, 4g으로 비율을 달리하여 앞선 실험에서 최적용매로 정해진 9% Ethyl acetate in 95% EtOH 수용액과 최적온도 조건인 35°C에서 90min 간 나머지 조건을 동일시 하고 녹차와 추출용매의 비율에 따른 카페인 추출효율을 알아보았다. 마지막으로 상기 녹차엽 분말을 회수하고 105°C의 건조오븐에서 12시간 동안 건조하여 수분 및 용매를 제거한 후 앞서 설명한 방법으로 녹차 내 남아있는 성분들을 HPLC로 분석하였다.

그 결과 1g/20ml 일 때 추출 효율이 가장 높게 나타났다.

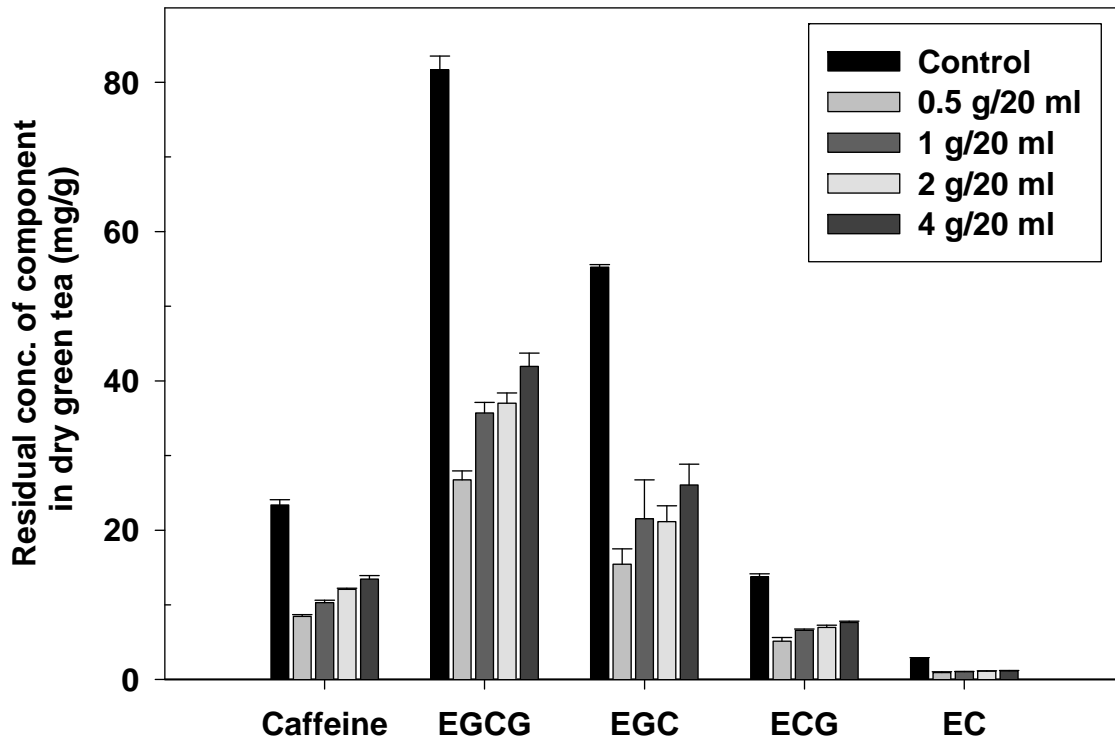


Fig. 3.4 Effects of extraction solid/solvent ratio on the extraction yields of green tea components in dry green tea. Control indicates the green tea before extraction.

위의 조건을 바탕으로 녹차 시료의 양을 scale up 하였을 때 Ethyl acetate를 이용하여 녹차내에 있는 카페인추출에 적용이 가능한지를 알아 보았다. 그 결과 거의 흡사한 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 3.5).

이렇게 대량으로 처리한 녹차시료의 향기성분 및 관능평가를 하기 위해 협동과제팀에게 제공하였다.

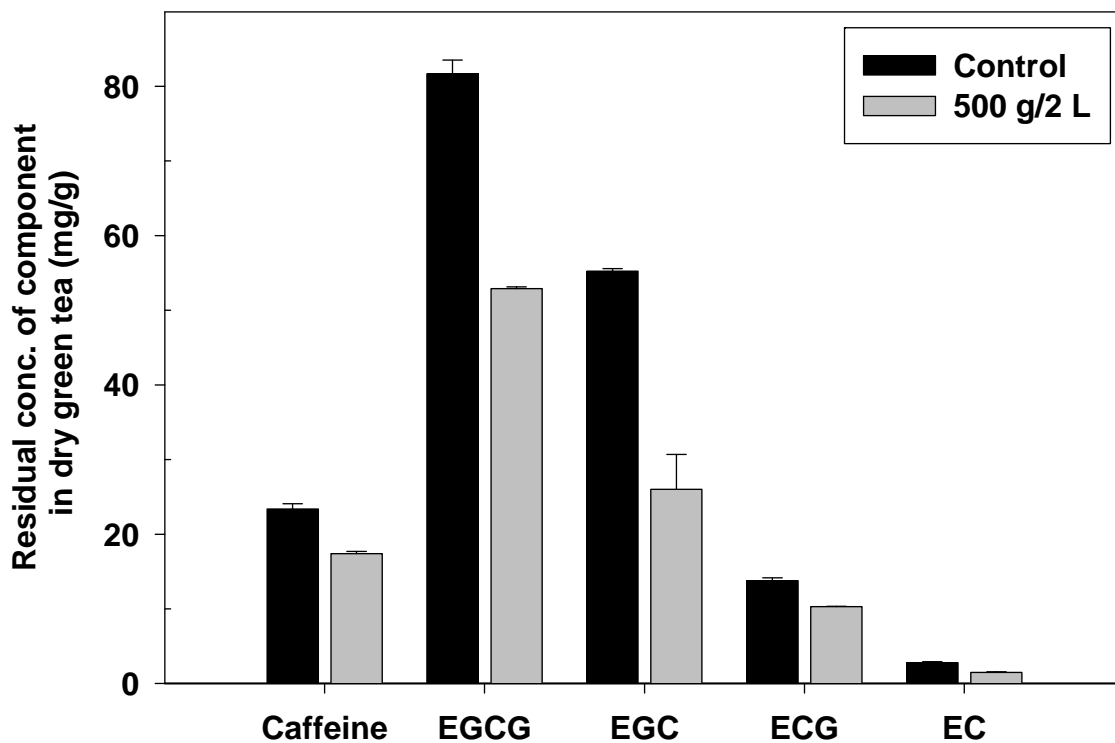


Fig. 3.5 Effects of extraction scale up on the extraction yields of green tea components in dry green tea. Control indicates the green tea before extraction.

## 6. 엽록소의 추출분석 및 정량

2절에서 설명한 초임계 이산화탄소를 이용하여 녹차엽의 선택적 탈카페인 추출조건 확립에 있어서 시간에 따라 카페인 제거량이 증가 할 수 록 녹차의 고유한 초록색 빛깔이 점점 연해지는 것을 육안으로 확인 할 수 있었다. 이는 녹차의 초록색 색소를 구성하는 중요한 성분인 클로로필이 카페인이 추출될 때 같이 추출된 것으로 사료된다. 그래서 탈카페인된 녹차의 제품화에 있어서 관능적인 요소도 중요하게 작용하기 때문에 녹차의 색소를 구성하는 물질 중 중요한 성분인 클로로필의 추출되는 양을 분석 하였다.

### 가. 초임계이산화탄소를 이용한 클로로필 추출

클로로필 추출 조건은 2절에서 최대의 카페인 추출가능 최적 조건 확립을 바탕으로 실험을 수행하였다.

건조된 녹차엽((주)녹차원, 한국) 20g을 Cutting mill(IKL, IK2836000, KOR)로 분쇄한 후 particle size analyzer를 사용하여 평균입자가 236.5 $\mu$ m 인 입자를 추출시료로 사용하였다. 상기에 서 분쇄된 녹차 중 10g을 취하고 여기에 조용매로서 4.6g 95% EtOH(v/v)/ 100g of CO<sub>2</sub> 로골고루

혼합함으로써 녹차가 침지되도록 하였다. 에탄올에 침지된 녹차를 100ml의 초임계 추출용기에 넣고 추출압력 300bar, 추출온도 70℃, 이산화탄소 유속 11.5g/min 의 조건으로 초임계유체 추출을 40분간 수행하였다. 이때 초임계이산화 탄소의 Residence Time은 6.12 min이다. 다음으로, 상기 조용매 침지 및 초임계유체 추출단계를 동일한 조건으로 3회 반복 수행하였다. 마지막으로 상기 녹차엽 분말을 회수하고 엽록소가 변색되는 것을 방지하기 위해 50℃의 진공건조오븐에서 12시간 동안 건조하여 수분 및 에탄올 성분을 제거한 후 녹차 내에 남아있는 클로로필의 함량을 분석하였다..

#### 나. 클로로필 분석

초임계 이산화탄소를 이용하여 추출된 클로로필을 분석하기 위해 Arnon method(Arnon ,1949)를 이용하였다.

상기 가의 조건으로 건조된 녹차잎 200mg을 삼각플라스크에서 넣고 85% Acetone 수용액에서 30분간 클로로필을 추출한다. 그 후 filter paper(whatmam No.2)를 통해 filtering 한 뒤 수용액을 50ml volumetric flask에 넣고 final volume이 50ml이 되도록 85% acetone을 이용하여 맞춰준다. 그 뒤 UV spectrophotometer 를 이용하여 663과 645nm의 파장에서 흡광도를 분석한 후 아래의 식을 적용하여 총 클로로필 함량을 측정하였다.

$$\text{Total chlorophyll(mg/L)} = 2.09 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663}$$

위 식을 적용하여 얻어진 초임계이산화탄소를 이용한 탈카페인 공정에서 추출시간에 따른 클로로필 성분변화량은 다음과 같다.

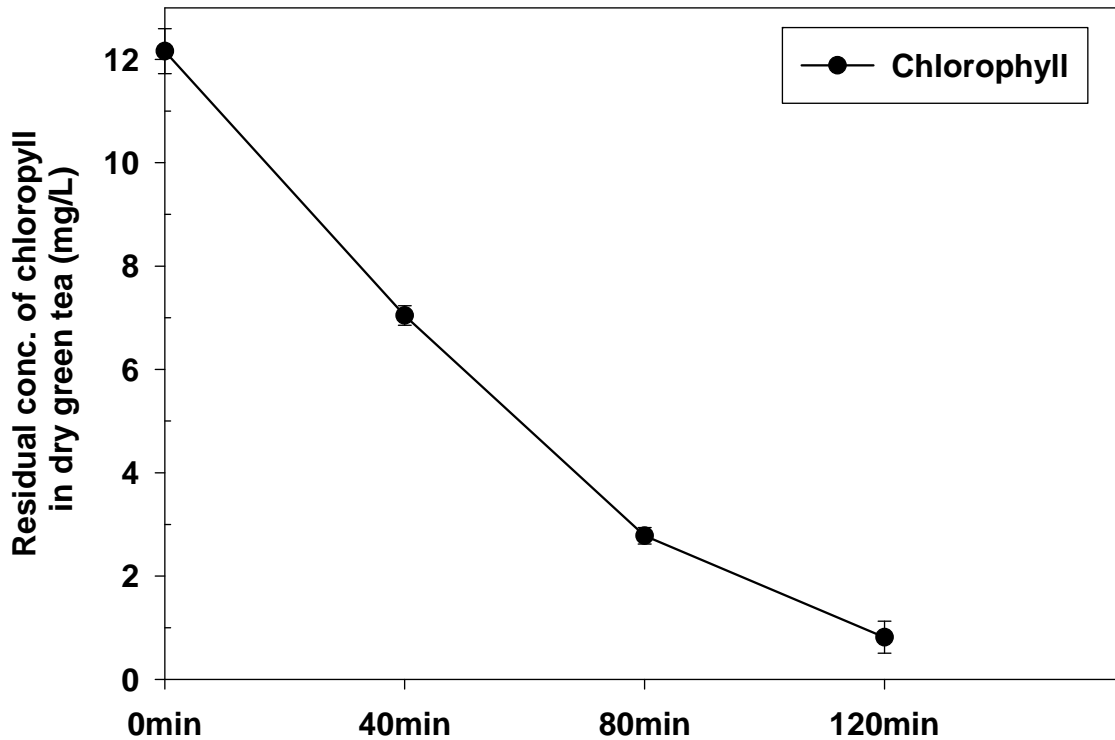


Fig. 3.6 Fig. 3.1 Effects of supercritical decaffeination conditions on chlorophyll contents in dry green tea.

위의 그래프를 보면 초임계이산화탄소를 이용한 탈카페인 공정에서 추출시간이 증가할 수 록 클로로필이 상당히 많은 양이 추출 되어 120min 간 추출하였을 때는 클로로필이 거의 남아있지 않음을 확인하였다. 그래서 이렇게 소실된 클로로필 성분을 복원해 주기 위해선 인공색소를 첨가 해주는 방법과 천연색소를 첨가해주는 방법을 고려해 볼 수 있겠다.

## 제 4 절 녹차시장 현황 및 탈카페인의 시장현황 조사 분석과 탈카페인 제거 공정의 경제성 평가

### 1. 국내 녹차 시장 현황

우리나라의 녹차 시장 규모는 1999년을 기준으로 약 930억원 정도로 추정되며 이 중 티백시장이 650억원으로 약 71%를 차지하고 있고 잎차류가 약 210억원으로 23%, 녹차음료가 약 60억원 정도로 6%의 점유율을 나타내고 있다. 특히 녹차 시장은 다른 국산차 시장 규모가 계속 감소되는데 비해 매년 20% 이상의 고성장을 지속하고 있고 대형 식품업체나 유통업체의 차 시장진입이 증가됨에 따라 2000년에는 드디어 1천억원을 초과하는 시장을 형성할 것으로 예상된다. 또한 국내



1인당 소비량에 있어서 겨우 31g 정도에 불과하여 아일랜드의 1/104, 일본의 1/35에 불과한 소비량을 나타내고 있어 향후 잠재시장 규모는 전망이 매우 밝은 편이다. 향후 차 시장의 주요 성장 요인으로는 첫째, 소득 수준의 증가에 따른 건강지향 마인드의 증가 둘째, 녹차 시장의 개방에 따른 차 가격의 인하와 다양한 상품의 도입 셋째, 1천억원대의 시장 진입에 따른 대형 식음료 업체 및 유통업체의 본격적인 시장 참여 넷째, 전과 및 인쇄매체를 통한 음용 장면의 제안과 홍보효과 다섯째, 소득 수준의 증가에 따른 당 첨가 음료로부터의 이탈 여섯째, 문화상품으로서의 인식 증가 등의 여러 요인에 의해 차 시장은 더욱 확대될 전망이다.

## 2. 국외 차 시장 현황

세계의 차 생산은 다원 관리 기술의 발달로 단위면적당 생산량이 증가되고 신규 다원의 개발로 전체 생산량이 지속적으로 증가추세를 나타내고 있으며 연간 총생산량은 1998년도의 경우 약 2,630천 톤이 생산되었다. 지역별 차 생산량은 아시아 지역이 전체의 83%를 차지하고 아프리카 지역이 약 13%, 그리고 남아메리카 지역이 2%로 대부분의 차가 아시아 지역에서 생산되고 있으며 인도, 인도네시아, 베트남, 케냐, 탄자니아, 모잠비크 등의 국가에서는 차의 재배가 지속적으로 증가되고 있고 호주, 뉴질랜드, 미국 등에서도 차의 재배가 시도되고 있다.

세계 최대 차 생산국은 인도로서 연간 약 84만 톤의 차를 생산하고 다음이 중국으로 82만 톤의 차를 생산하며 스리랑카 3위, 케냐가 4위를 차지하고 있다. 녹차는 주로 아시아 지역에서 생산되고 있는데 중국이 422천 톤으로 중국 전체 생산량의 71%를 차지하는 세계 최대의 녹차 생산국이고 다음이 일본으로 연간 약 88.7천 톤, 인도네시아가 30천 톤, 베트남이 29.6천 톤을 생산하며 최대의 홍차 생산국인 인도에서도 약 8.3천 톤의 녹차를 생산하고 있다. 차 수출입 상황은 차가 재배되지 않는 영국이 연간 17만 톤, 러시아가 14만 7천 톤, 회교국가인 파키스탄이 21만 톤을 수입하며 일본이 우롱차와 홍차, 녹차를 포함해서 4만 5천 톤을 수입하고 있는데 특히 최근에는 차를 이용한 제품의 개발과 녹차 음료 시장 확대로 97년의 경우 약 11,307톤의 녹차를 수입하였다.

또한 녹차의 항산화 작용과 암 예방 효과에 대한 연구가 활발히 진행됨에 따라 미국이나 독일 등 유럽 지역에서도 차의 소비가 급격히 증가 추세를 나타내고 있어 기존의 영연방 국가나 술을 마시지 못하는 회교국가 중심에서 커피를 주로 마시는 국가로 소비가 확대되고 있다. 세계에서 가장 많은 차를 수출하는 국가는 스리랑카로 생산량에서는 4위이지만 생산량의 72%에 해당하는 17만 8천 톤을 수출함으로써 연간 3억 6천9백만 달러의 외화를 획득하고 있다. 또 아프리카의 신흥 차 생산국인 케냐도 생산량의 85%인 21만 8천 톤을 수출하여 수출량에 있어서는 스리랑카보다 많지만 가격적인 면에서 스리랑카산이 높기 때문에 전체 수출 금액은 적다.

이 외에도 영국은 차를 전혀 재배하지 않으면서도 수입한 원료를 가공하여 수출함으로써 연간 2억 달러의 외화를 획득하고 있고 중국도 최근 몇 년 동안 재고가 많아 녹차의 수출가격이 떨어지는 문제가 있었으나 99년에 와서 일본 녹차의 생산 감소와 유럽지역의 소비 확대로 전체 수출량이 증가하고 있는 실정이다. 그리고 최근 차의 소비 패턴은 기존의 정통적인 음용 방법 이외에 차를 이용한 음료수나 식품, 생활용품, 의약품에 이르기까지 매우 다양하게 소비되고 있으며 국가별 총소비량은 인도가 59만 7천 톤으로 가장 많고 러시아가 14만 9천 톤으로 2위, 영국이 14만 4천 톤으로 3위를 차지하고 있다.

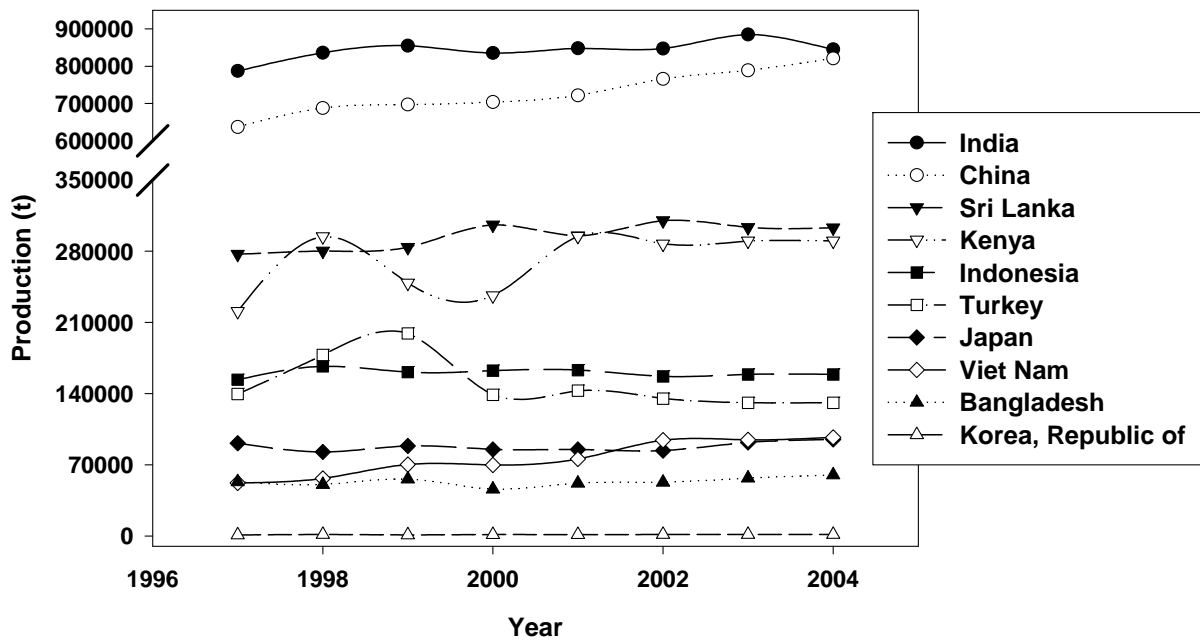


Fig. 4.1. Trends of tea production in major tea producing countries.

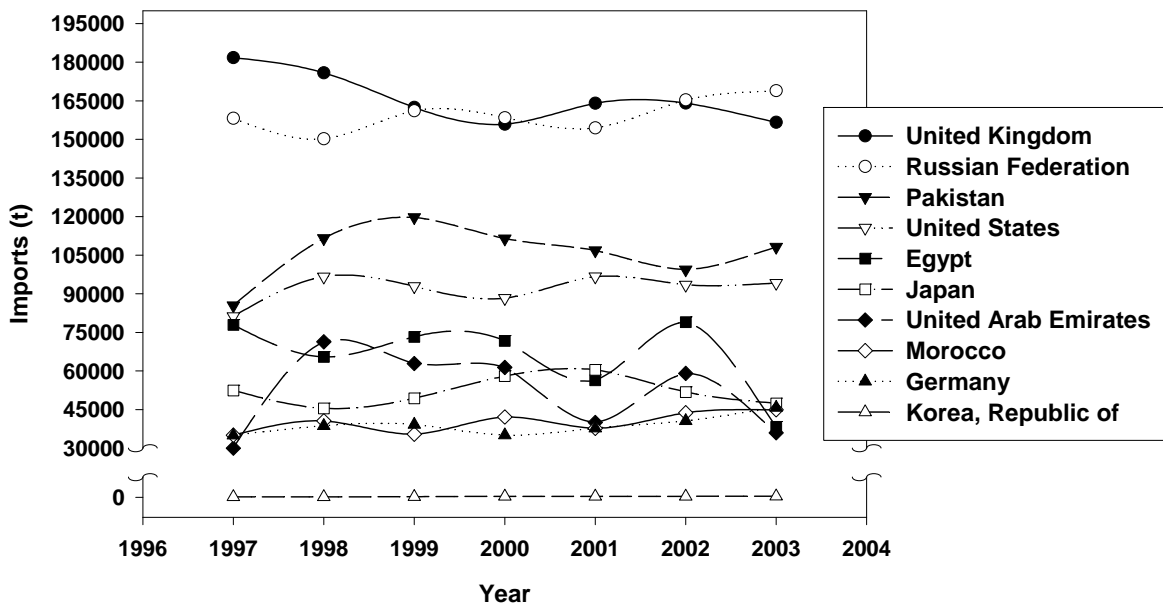


Fig. 4.2. Trends of tea imports in major tea consuming countries.

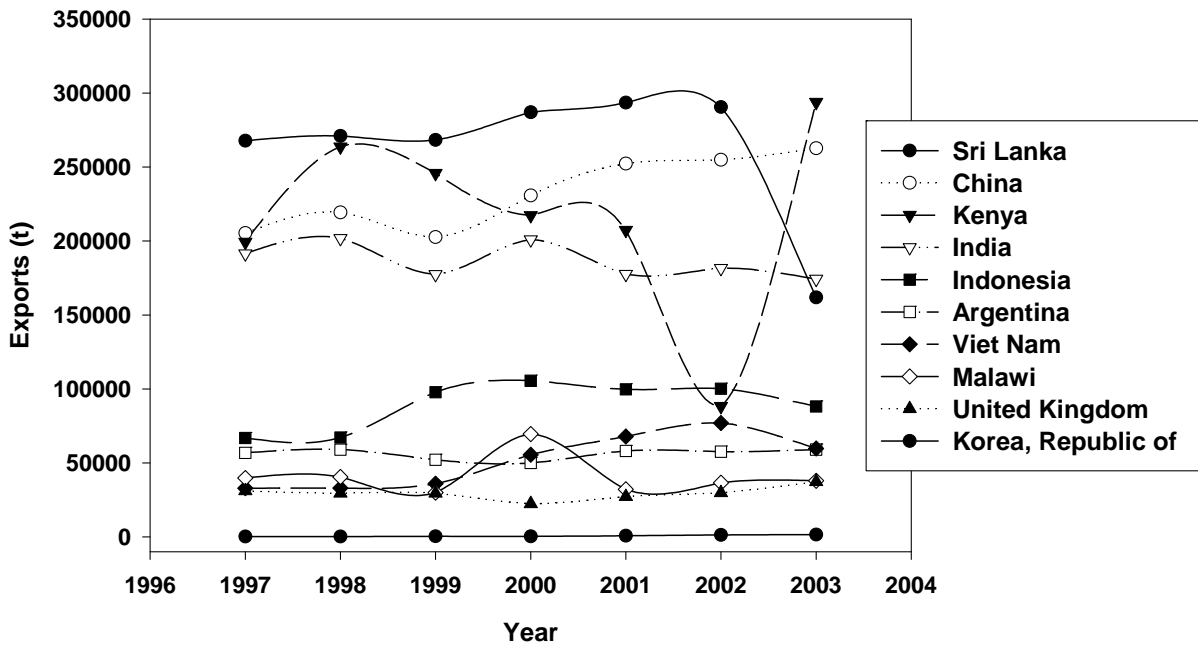


Fig. 4.3. Trends of tea exports by major tea producing countries.

### 3. 탈카페인 녹차의 기존 시장에 대한 영향 분석

음료 부문 분석 업체 Zenith International에서 발표한 새로운 보고서에 따르면 녹차의 건강상의 이점을 입증하고 있는 연구의 흐름이 2004년 영국 내 녹차 음료의 소비량을 1억 리터 이상으로 끌어올렸다고 한다. 특히 주목할 점은 녹차 추출물의 암세포에 저항하는 능력과 지나친 항산화 효과 등의 우려에 따른 보고에도 불구하고 전반적으로 건강에 좋을 것이라는 긍정적인 이미지의 창출을 통해 여과되고 있다는 것이다. 특히 Zenith의 분석가인 Anya Bourke는 보고서에서 소비자들이 건강상 이점과 함께 뭔가 특별한 차이점을 원하고 있다고 덧붙이고 있다.

현재 FAO에 따른 통계에 따르면 차 시장 역시 다른 많은 농업과 관련된 상품들과 마찬가지로 중국의 생산량이 끝없이 치솟고 있고 이는 단가 하락으로 이어지고 있다. 때문에 차별화된 고품격의 국내산 녹차 개발을 위해서라도 그 품질의 향상에 대한 다방면의 노력이 필요하다. 물론 기존의 농업기술연구소 등의 노력으로 인해 처리방법의 변화에 따른 차별화를 노려온 것이 사실이나, 녹차를 소비하는 소비층의 관심이 건강에 초점을 두고 있는 만큼 이에 상응하는 노력으로 탈카페인 녹차의 개발이 시급한 현실임. 현재, 중국과 기타 아시아 국가들의 상품이 재배 후 생산에 대다수 머물러 있지만 세계에서 인정받고 있는 그들의 기술력과 인력을 통한 새로운 품질 개발은 시간 문제임. 이에 새롭게 시장규모를 증가시키며 우리 고유의 차를 고급 브랜드하며 세계 속에 그 위상을 세우기 위해서라도 이에 대한 본 연구진의 연구 및 투자가 이루어져야 하며 나아가 국제 특허의 출원으로 인한 새로운 분야의 중주국으로 거듭나는 노력도 수반하여 세계 속에 한국 녹차의 위상을 세우는 일을 기대할 수 있을 것이다.

#### 4. 녹차엽 탈카페인공정의 경제성 및 효율성 평가

##### 가. 녹차엽 탈카페인 공정의 경제성 평가

###### 1) 감가 상각비

▲ 기계명 : 초임계유체추출장치

▲ 제원

- 용량: 12 L \* 2, 재질 : 스테인리스 스틸, 제조사 : Thar Tech.(U.S.A.)

▲ 보유회사 : (주) 타렉스 (충남, 아산)

▲ 취득원가 : 800,000,000원

▲ 내용연수(상각률) 10년 (0.259)

1년 : 800,000,000원 \* (1-0.259) = 592,800,000 원  
2년 : 592,800,000 원 \* (1-0.259) = 439,264,800 원  
3년 : 439,264,800 원 \* (1-0.259) = 325,495,217 원  
4년 : 325,495,217 원 \* (1-0.259) = 241,191,956 원  
5년 : 241,191,956 원 \* (1-0.259) = 178,723,239 원  
6년 : 178,723,239 원 \* (1-0.259) = 132,433,920 원  
7년 : 132,433,920 원 \* (1-0.259) = 98,133,535 원  
8년 : 98,133,535 원 \* (1-0.259) = 72,716,949 원  
9년 : 72,716,949 원 \* (1-0.259) = 53,883,259 원  
10년 : 53,883,259 원 \* (1-0.259) = 39,927,495원

###### 2) 원료 및 재료비

- 이산화탄소 단가 : 60kg/6천원
- 에탄올(주정) : 1600원/리터
- 전기세 : 20만원/월
- 녹차 : 200g/만원

###### 3) 하루에 녹차 4kg씩 한달 간 탈카페인 하는데 드는 비용

- 녹차 : 4kg/일\*30일=120 kg, 6,000,000원
- 시간 : 11시간/일\*30일=330시간
- 에탄올 : 80 L/일\*30일=2400 L, 3,840,000원
- 전기세 : 20만원/월
- 인건비 : 200만원/월\* 2명=4,000,000원
- 유지 및 보수비 : 100,000원

∴ 생산 단가:14,140,000원(총 생산비용)/120kg(총 생산량)=117,833원/kg=7,069원/60g

#### 4) 제품화 전망

초임계 이산화탄소를 이용한 탈카페인 녹차를 제품화 하는데 있어 초기 장치 비용은 좀 비싼편이나 위에서 본 바와 같이 다른 원료나 유지 보수비용은 적게 들고 특히 주재료인 이산화탄소의 경우 단가도 저렴하지만 recycle이 가능하기 때문에 매우 경제적이다. 현재 초임계이산화탄소를 이용하여 제품화 되어 팔리고 있는 (주)CJ 의 황금참기름의 경우 생산단가가 일반참기름 생산단가의 3배가량 많이 들어서 소비자가격을 일반참기름의 2배정도 비싸게 하여 이윤을 조금 남기면서 팔고 있다. 하지만 환경친화적이고 웰빙제품이란 장점 때문에 꾸준히 소비자들에게 팔리고 있기 때문에 계속해서 이윤을 남기고 있다.

현재 시중에 판매 되고 있는 녹차 티백 40개 들이 60g(NET Wt.)의 소비자 가격이 평균 6,000 원 선이다. 이에 반에 그리고 우리가 가지고 있는 녹차의 생산 단가는 **60g에 7,000원 수준**이기 때문에 충분히 가격 경쟁력이 있고 시중에 보편적으로 팔리는 녹차 티백에 있는 카테킨성분 보다 월등히 많은 양의 카테킨을 함유하고 있기 때문에 이것을 제품화 하게 되면 가격도 저렴하고 카페인은 제거 되고 카테킨은 풍부한 녹차제품을 만들 수 있을 것으로 기대된다. 또한 웰빙이 트렌드인 요즘 시대에 소비자들에게 생리학적 안전성이 우수한 녹차를 제공함으로써 좀 더 선택의 폭을 넓혀 줄 수 있고 전통적인 녹차 음용방법 이외에 요즘 젊은층에서 유행하는 냉차 시장에도 적용가능하고 아이스크림이나 화장품등 녹차 가공품에도 폭넓게 적용이 가능하다고 생각된다.

## 제 5 절 녹차엽의 생리적 안전성 평가

### 1. 추출물의 수율

녹차는 항산화 활성을 측정할 양만큼 추출하였다. 우리 실생활에서 일상적으로 마시는 녹차는 거의 대부분 물에 우려낸 것이므로 이에 근거하여 열수로 시행하였다. 녹차 총 2g 중 0.329g의 열수 추출물을 얻어 수득율은 건체중량을 기준으로 16.35%를 나타내었다.

#### 가. 총 폴리페놀 함량

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가지고 있다. 이들은 phenolic hydroxyl기를 가지고 있기 때문에 단백질 등의 거대 분자들과 결합하는 성질을 가지고 있으며 항산화, 항미생물 활성 효과 등의 생리활성을 가져 이에 녹차의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 녹차 열수 추출물을 농도별로 제조한 시료(100µg/ml~750µg/ml)는 gallic acid의 폴리페놀 함량으로 나타내었다. 실험 결과, 녹차 1mg당 gallic acid 252.92µg이 들어 있음을 확인할 수 있었다. 이 같은 결과는 다른 식물성 물질과 녹차의 총 폴리페놀 함량과 비교하였을 때 녹차가 상당히 높은 폴리페놀 농도를 가지고 있음을 확인해 주었다.

#### 나. Ferric reducing/antioxidant power assay

FRAP assay는 항산화력을 측정하는 방법으로  $Fe^{3+}$ -TPTZ가  $Fe^{2+}$ -TPTZ로 환원되는 것을 이용하여 측정된다. Benzie등은 이 방법에 대해 재현성이 쉽게 관찰되며 함유되어 있는 항산화제들이 농도에 직선적으로 비례하여 총 항산화 효과를 직접적으로 측정할 수 있다고 하였다. 녹차 열수 추출에서 FRAP assay에 의한 항산화력은 Fig 5.1.과 같다. 농도별로 제조한 시료(10 $\mu$ g/ml~200 $\mu$ g/ml)는  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 농도로 나타내었는데 positive control인 ascorbic acid에 비하여 약 2배정도 낮은 수치를 보였다. 이는 기존 항산화제의 항산화력과 비교하였을 때 녹차는 상당히 높은 가능성을 가지고 있음이 조사되었다.

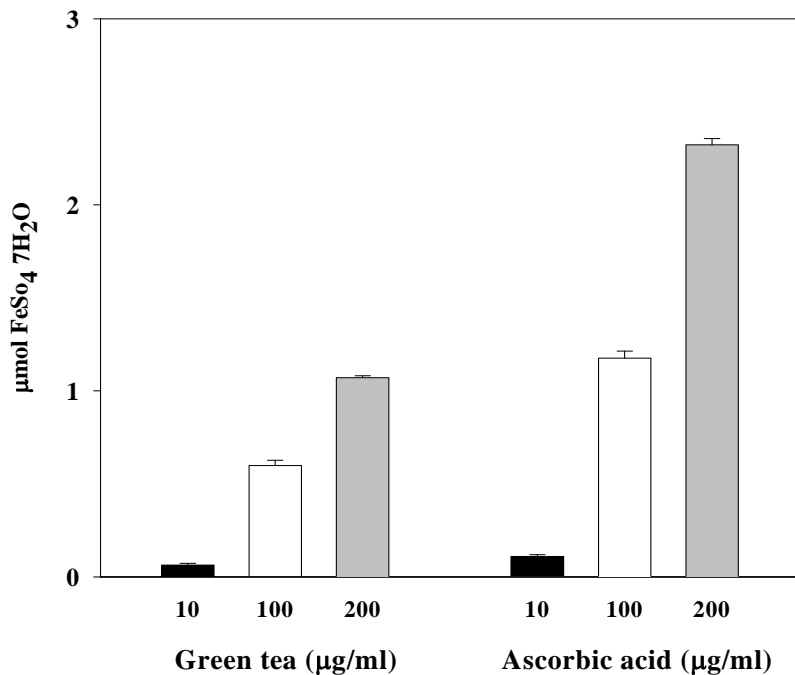


Fig. 5.1. FRAP assay from green tea and ascorbic acid

\* significantly different from control by T-test ( $P < 0.05$ )

#### 다. DPPH radical 소거능

녹차의 열수추출물이 *in vitro* system에서 radical scavenging activity를 가지고 있는지를 알아보기 위해 수행한 실험이다. DPPH는 ascorbic acid, tocopherol, 방향족 화합물 등에 의하여 환원되어 짙은 자색이 탈색됨으로서 항산화 물질의 수소공여능을 측정한다. Fig. 5.2.를 보면 positive control인 ascorbic acid에 비하여 녹차의 DPPH radical 소거능은 약 1.2배정도 낮게 나타나고 있다. 이는 기존의 항산화제와 비교하였을 때 천연 항산화 물질로서 녹차가 상당히 높은 가능성을 가지고 있음을 보여주고 있다.

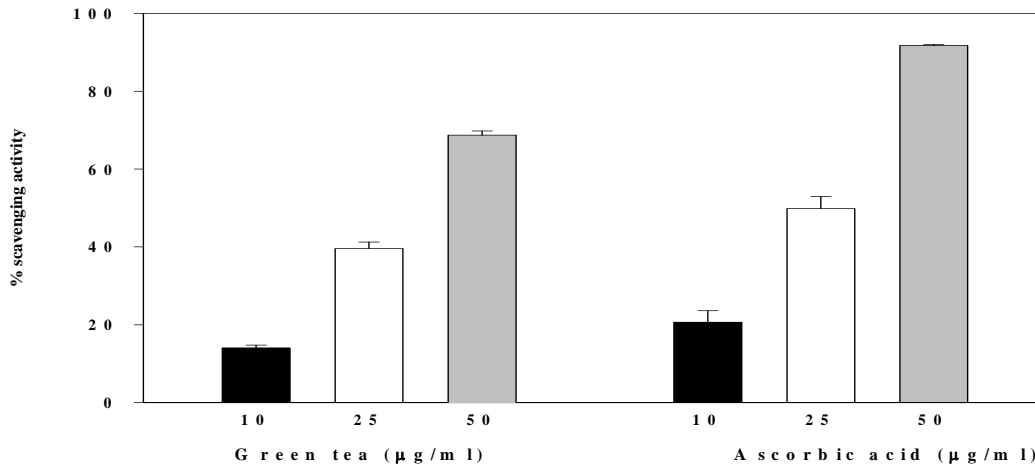


Fig. 5.2. DPPH radical scavenging activity from green tea and ascorbic acid

\* significantly different from control by T-test ( $P < 0.05$ )

#### 라. 총 flavonoid 함량

열수 추출된 녹차는 농도별로 제조되어(100µg/ml~750µg/ml) quercetin의 농도로서 flavonoid 함량이 나타내어졌다. 1mg의 녹차에는 143.67µg의 quercetin이 함유되어있는 있었다. 앞서 시행한 모든 실험 결과들로 살펴보았을 때, 녹차는 항산화 기능성이 상당히 높은 물질임을 추측할 수 있다.

#### 2. 세포 생존률

MTT assay는 노란색의 가용성 tetrazolium 염이 살아있는 세포의 미토콘드리아에 의해 파란색의 불용성 formazan 생성물로 환원되는 원리를 이용한 실험이다. 따라서 MTT 값은 살아있고 대사적으로도 왕성한 세포의 농도를 반영한다고 할 수 있겠다.

먼저 caffeine의 독성을 MTT를 이용하여 측정한 결과 caffeine 농도(0~80mM)에 따른 cytotoxicity가 유의적 차이를 보이고 있음을 알 수 있다(Fig. 5.3). 특히 5mM인 경우 1mM의 caffeine이 주는 독성보다 적은 효과를 보이고 있음을 알 수 있다. 오히려 아무것도 처리하지 않은 대조군에 가까운 세포 생존률을 보이고 있다. 따라서 우리는 caffeine 처리는 하되, 세포 생존률에 크게 지장을 주지 않는 5mM caffeine을 기준으로 본 실험에 임하였다.

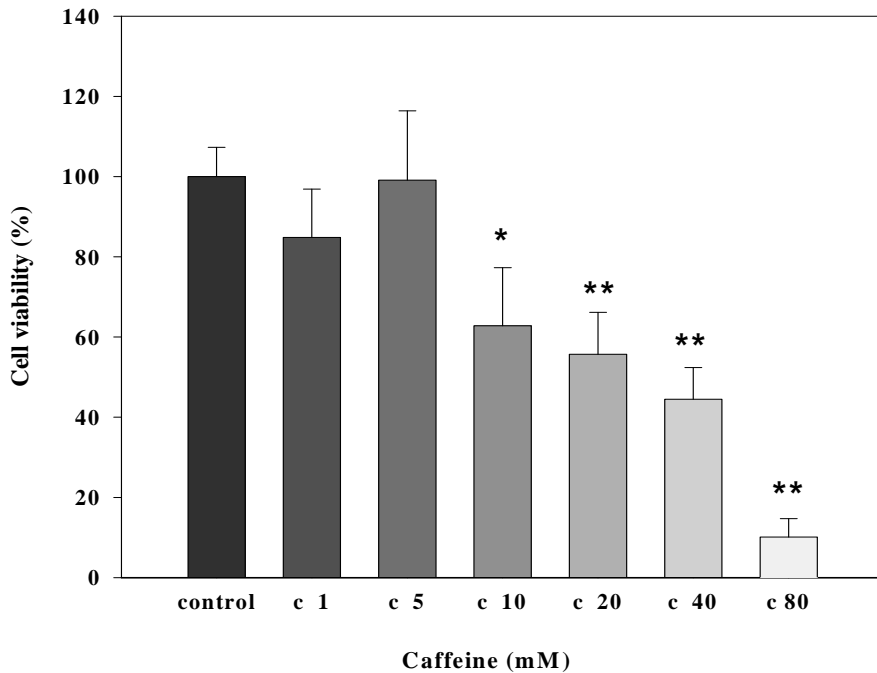


Fig. 5.3. Caffeine concentration dependent

\* significantly different from control by T-test ( $P < 0.05$ )

\*\* significantly different from control by T-test ( $P < 0.01$ )

Cell에 25 $\mu$ M EGCG, 5mM caffeine을 처리함으로써 녹차의 모델 시스템을 통한 *in vitro* system에서의 세포 생존률을 확인하였다(Fig. 5.4, Fig. 5.5). 또한 여기에 2.5 $\mu$ M allyl alcohol 또는 5mM acetaminophen을 처리함으로써 녹차와 함께 알코올이나 약물제를 복용하였을 때 세포 생존률에 어떠한 차이가 있는지를 보고자 하였다. Fig. 5.4.는 allyl alcohol이 처리된 실험으로서 우리가 일상적으로 마시는 녹차를 caffeine과 EGCG 처리군으로 보았을 때, allyl alcohol이 첨가되면 세포 생존률이 절반 이하로 줄어드는 것을 볼 수 있다. 여기서 caffeine이 제거되면 세포 생존률이 caffeine이 들어있을 때보다 약 1.4배정도 상승함을 보이고 있다. Allyl alcohol이 첨가되지 않은 군끼리 비교해보아도 caffeine과 EGCG 처리군은 EGCG만을 처리한 군에 비해 세포 생존률이 상승하고 있음을 알 수 있다. Fig 5.5.에서 확인해보면, acetaminophen 처리한 군들도 allyl alcohol을 처리한 군과 비슷한 양상을 보이고 있다. 그러나 caffeine만을 처리한 군은 대조군에 비하여 오히려 세포 생존률이 상승함을 보이고 있어 이 같은 결과는 caffeine 그 자체의 독성이라기보다는 다른 독성물질의 영향에 따른 독성효과라고 보인다.

Lactate dehydrogenase(LDH)는 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)를 조효소로 사용하여 pyruvate와 L-lactate 사이의 산화, 환원 반응에 관여하는 해당효소의 일종이다. 이 반응은 NADH가 감소되면서 젖산(lactic acid)과 NAD<sup>+</sup>가 생성되는 원리를 이용한 것이다. 즉, 산화 스트레스에 의한 다량의 과산화물이 생성되면 세포막을 손상하여 세포의 LDH 유출이 증가되기 때문에 LDH activity는 세포막 integrity의 지표로 사용된다. Fig. 5.4.을 보면 MTT



assay와 정반대의 결과를 나타낸다. LDH activity가 높아진다는 것은 그만큼 세포막 손상이 많이 일어났다는 것을 뜻하기 때문이다. 이 역시 caffeine이 처리된 군에 독성물질이 첨가되면 LDH activity가 상승됨을 보이고 caffeine이 제외된 군에는 낮아짐을 나타내고 있다.

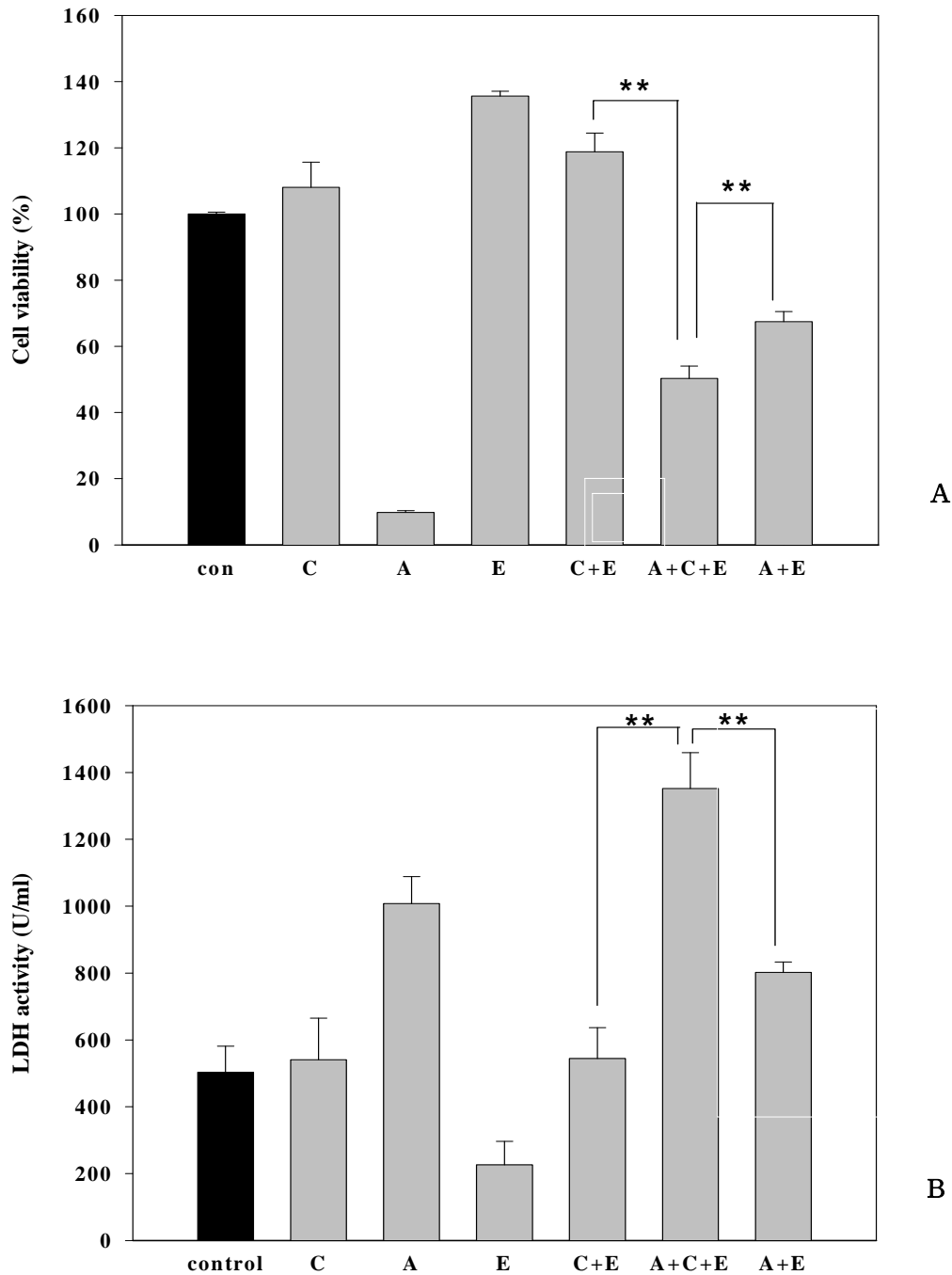


Fig. 5.4. Hepatotoxicity from rat.  
 C: 5mM caffeine, A: 2.5 $\mu$ M allyl alcohol, E: 25 $\mu$ M EGCG,  
 (A) caffeine toxicity with allyl alcohol (MTT)  
 (B) caffeine toxicity with allyl alcohol (LDH)

\* significantly different from control by T-test ( $P < 0.05$ )  
 \*\* significantly different from control by T-test ( $P < 0.01$ )

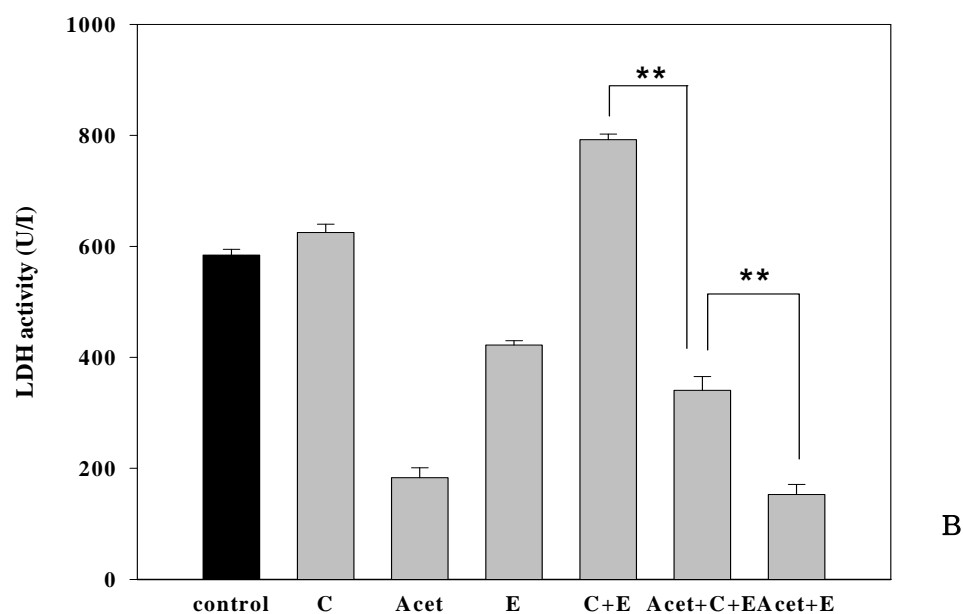
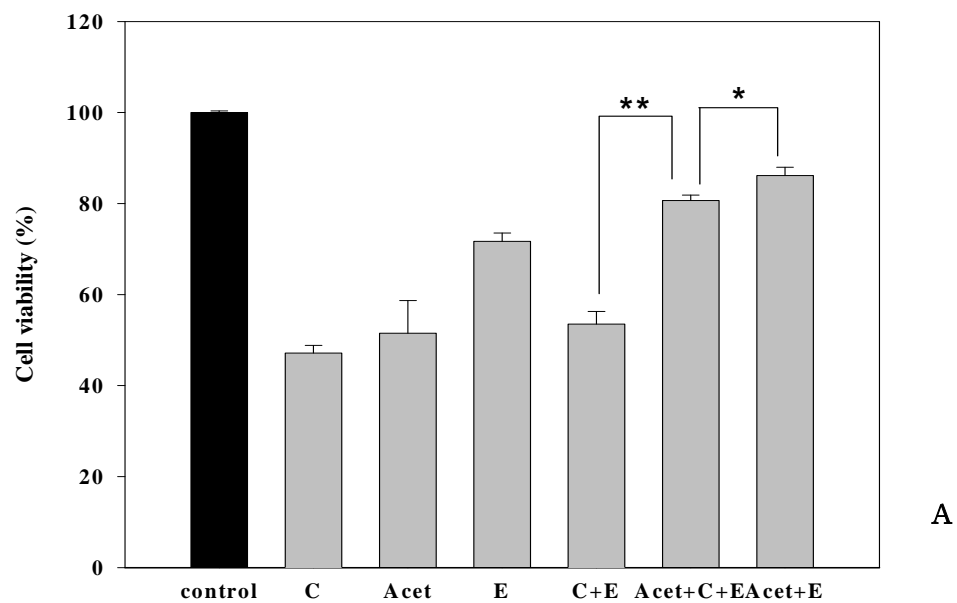


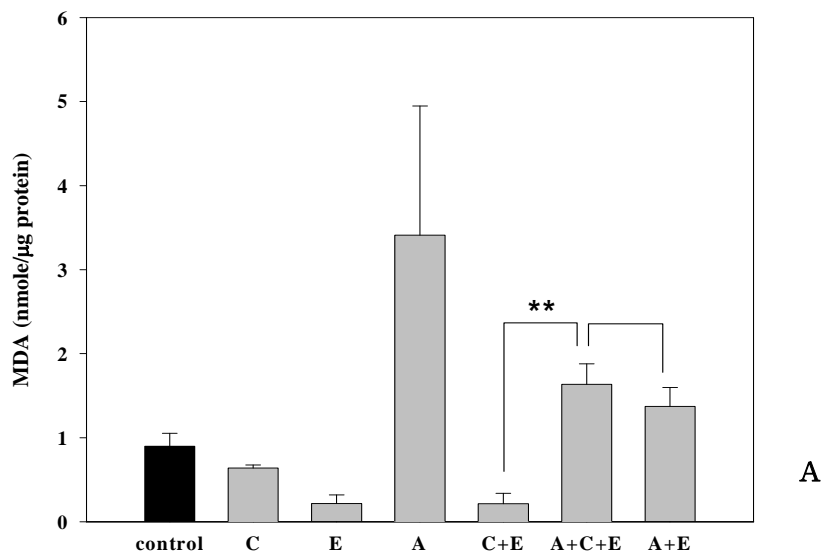
Fig. 5.5. Hepatotoxicity from rat.  
 C: 5mM caffeine, Acet: 5mM acetaminophen, E: 25 $\mu$ M EGCG,  
 (A) caffeine toxicity with acetaminophen (MTT)  
 (B) caffeine toxicity with acetaminophen (LDH)

\* significantly different from control by T-test ( $P < 0.05$ )  
 \*\* significantly different from control by T-test ( $P < 0.01$ )

### 3. Lipid peroxidation

이 실험은 세포막 손상 정도와 관련된 것으로 세포 내 ROS(reactive oxygen species)가 발생하면 인지질막에 다량 함유되어 있는 불포화지방산 수소원자를 제거하게 된다. 이로써 지질과산화의 연쇄반응이 유발되고 지방산 사슬에서 peroxy radical과 alkoxy radical이 생성된다. 이것들은 수소원자와 결합하여 lipid hydroperoxide를 생성하는데 이는 분해되어 malondialdehyde(MDA) 등의 aldehyde를 생성한다. 이렇게 생성된 지질과산화물은 세포막의 투과성을 증가시키고 체액의 손실을 일으켜 단백질 변화를 유발한다. 이는 암이나 동맥경화, 고혈압 등의 각종 질병을 일으킬 수 있다. 본 실험에서는 TBARs 법에 의해 지질과산화의 생성지표인 malondialdehyde(MDA)를 측정해보았다.

Fig. 5.6.을 보면 녹차의 모델인 caffeine과 EGCG군에 비해 Allyl alcohol이 첨가된 실험군의 경우 약 1.3배정도 MDA값이 높음을 보이고 있다. 또한 여기서 caffeine이 제외되었을 때는 MDA 값이 낮아져 앞서 실험했던 세포 생존률과 유사한 경향을 보이고 있다. Acetaminophen을 처리한 군의 경우 모든 군이 대조군에 비해 낮은 값을 보이고 있을 뿐 아니라 절대적인 수치도 매우 낮다. 그러나 그 값이 나타내는 경향은 allyl alcohol의 경우와 크게 다르지 않음을 알 수 있다.



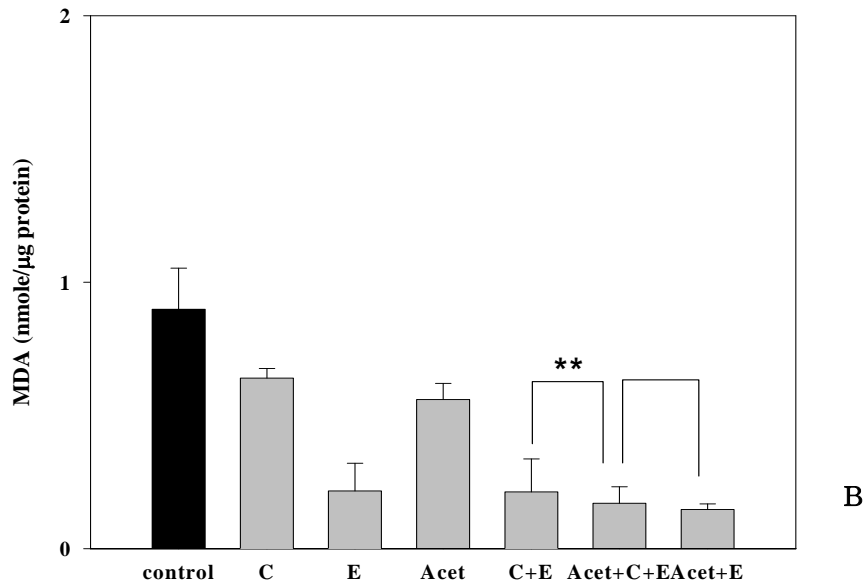


Fig. 5.6. Lipid peroxidation

C: 5mM caffeine, A: 2.5μM allyl alcohol,

E: 25μM EGCG, Acet: 5mM acetaminophen

(A) caffeine toxicity with allyl alcohol

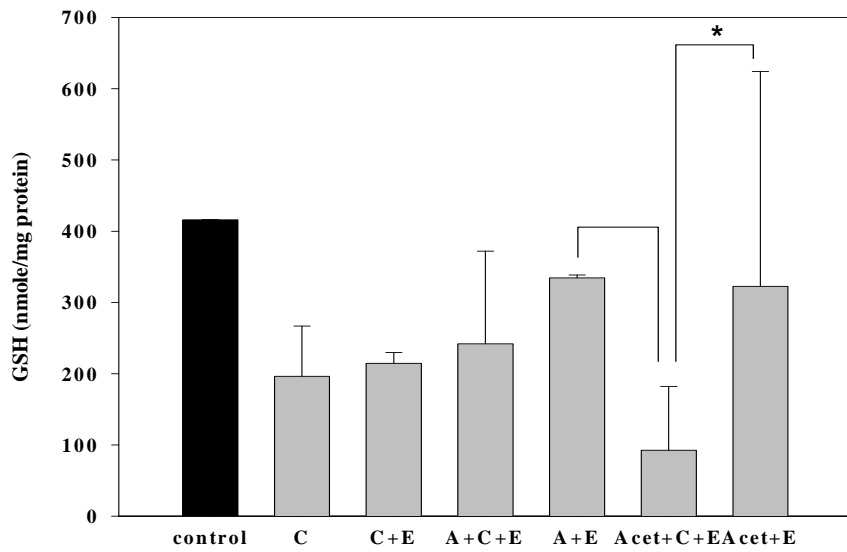
(B) caffeine toxicity with acetaminophen

\* significantly different from control by T-test ( $P < 0.05$ )

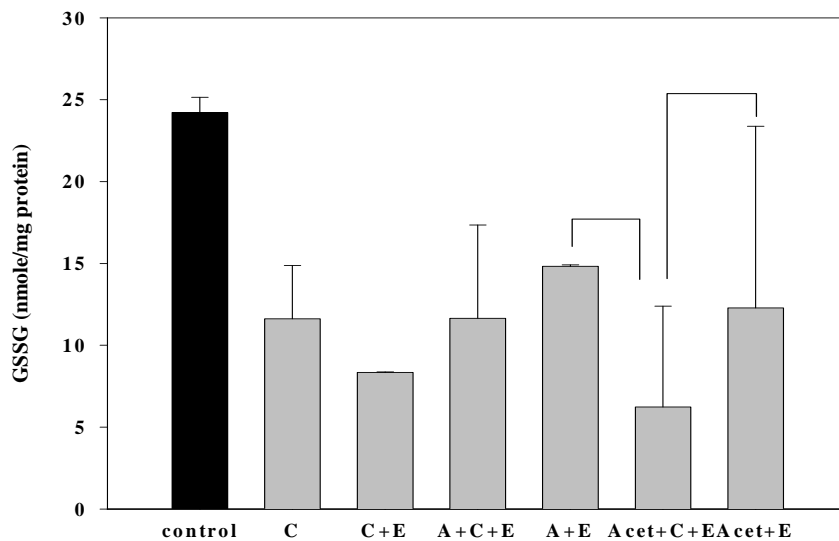
\*\* significantly different from control by T-test ( $P < 0.01$ )

#### 4. GSH & GSSG contents

Glutathione (GSH)은 포유동물의 세포에서 주된 nonprotein sulfhydryl 화합물로서 세포가 증식하는 동안 아미노산의 수송, 단백질의 합성, DNA deoxyribonucleotide 전구물질 합성, 효소활성, 대사작용, disulfide의 환원 그리고 free radical과 reactive oxygen compounds에 대한 세포의 보호작용 등 많은 생물학적인 기작에 있어 중요한 역할을 수행하는 아미노산 유도체이다. Fig. 5.7.을 보면 allyl alcohol이나 acetaminophen이 들어간 녹차 모델시스템의 경우 낮은 GSH 함량을 보이지만 caffeine이 제거되었을 경우 많게는 3배까지도 GSH 함량이 높아지는 것을 확인할 수 있다. GSSG의 함량은 GSH와 같은 모델을 비교해 보았을 때, 유의성을 보이지는 않고 있다. 그러나 GSSG의 함량이 GSH보다 함량이 매우 낮기 때문에 비교하기가 어렵다고 판단되어진다.



A



B

Fig. 5.7. Effect of caffeine on the hepatic GSH & GSSG contents in rats.

C: 5mM caffeine, A: 2.5μM allyl alcohol,  
E: 25μM EGCG, Acet: 5mM acetaminophen

(A) caffeine toxicity with allyl alcohol

(B) caffeine toxicity with acetaminophen

\* significantly different from control by T-test ( $P < 0.05$ )

\*\* significantly different from control by T-test ( $P < 0.01$ )

## 5. CYP1A mRNA level 측정

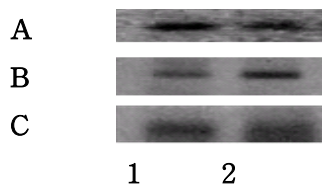


Fig. 5.8. RT-PCR

A: GAPDH, B: CYP1A1, C: CYP1A2,

1: control, 2: 5mM caffeine

간의 여러 가지 중요한 역할 중의 하나가 해독작용을 하는 것이다. 간에 어떠한 독성물질이 침투하였을 때, 해독작용을 거치면서 Cytochrome P450 (CYP450)이라는 효소가 발현하게 된다. 이 효소가 여러 유독물질을 대사시켜 유독하지 않은 물질로 만들기 때문에 CYP 효소가 어느 정도 발현되어 있는지를 살펴보는 것은 간에 존재하는 독성물질의 정도를 살펴볼 수 있는 지표라 할 수 있겠다. 본 실험은 CYP450의 mRNA level을 측정하였다. mRNA level을 측정하는 이유는 무엇보다도 단백질을 만드는, 즉 CYP 효소로서 작용할 수 있는 물질을 만들어내는 것이기 때문이다.

caffeine을 각 대조군과 5mM caffeine으로 처리해보았을 때, CYP1A1은 5mM에서 증가하나 CYP 1A2에서는 별 변화를 보이지 않고 있음을 확인할 수 있다.

## 6. EROD / MROD Assay

앞서 실험한 RT-PCR의 결과는 mRNA level을 보여주는 것이라면, 본 실험은 mRNA가 실질적으로 얼마나 단백질 즉, 효소로 변화가 되었는지 보여줄 수 있다. CYP1A1은 EROD(7-ethoxyresorufin O-deethylase)라는 효소를 생성하고, CYP1A2는 MROD(methoxyresorufin O-demethylase)를 각각 생성한다. 따라서 이러한 효소의 측정은 간에서의 특정 독성물질의 해독이 얼마나 진전되고 있는지를 알려주는 지표라 할 수 있다. Fig. 5.9.를 살펴보면, Caffeine을 농도별로 처리하여 EROD와 MROD activity를 측정한 결과를 나타내고 있다. 5mM caffeine을 처리하였을 경우 두 효소 모두 activity가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

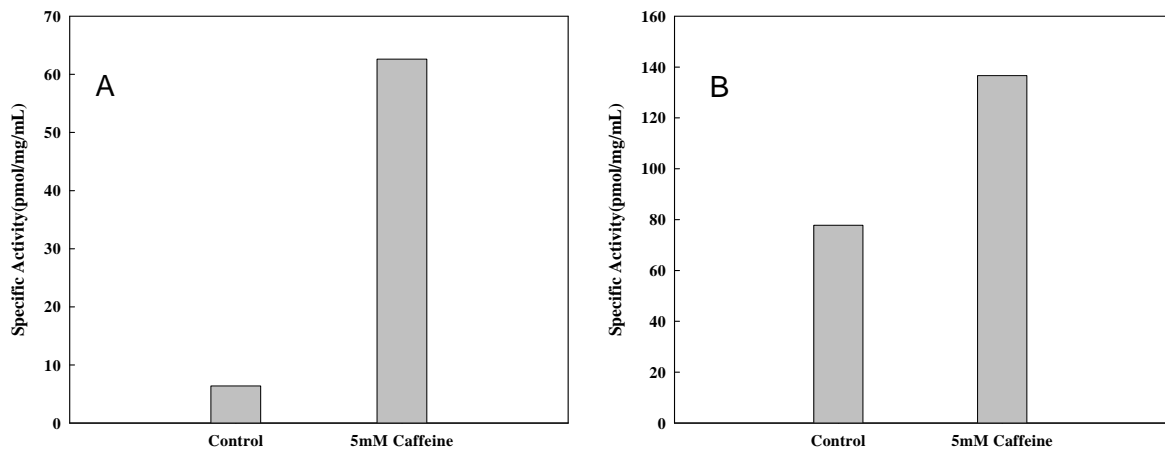


Fig. 5.9. EROD / MROD specific activity

A: EROD(7-ethoxyresorufin O-deethylase) B: MROD(methoxyresorufin O-demethylase)

\* significantly different from control by T-test (P < 0.05)

\*\* significantly different from control by T-test (P < 0.01)

## 제 6 절 초임계이산화탄소에 의해 탈카페인된 녹차엽의 in vitro 안전성 및 기능성 평가

### 1. 실제 녹차엽의 항산화활성 효능

#### 가. 녹차추출물 준비과정

우리 실생활에서 일상적으로 마시는 녹차는 물에 우려낸 것이므로 이에 근거하여 녹차엽의 추출을 열수로 시행하였다. 탈카페인 된 녹차와 일반 녹차를 각각 막자사발로 미세한 분말로 가루를 낸 후 10% (v/v) 열수로 30분간 65°C에서 우려내었다. Whatmann filter paper No. 2로 거른 후 원심분리기로 침전물을 제거하여, 한 번 더 0.2 µM 필터로 제균 과정을 거쳐 동결건조 시킴. 전체 중량을 기준으로 수득율은 탈카페인 녹차는 23%, 일반 녹차는 16.6%를 나타냈다.

#### 나. 녹차추출물의 성분 함량

위와 같은 추출과정을 거친 녹차(G)와 탈카페인 녹차(D)는 HPLC로 성분함량을 분석하여 아래와 같은 표를 얻었다.

Table 6.1. 녹차추출물의 성분 함량 분석 (mg/g dry material)

	녹차(G)	탈카페인 녹차(D, C10)
<b>Caffeine</b>	95.18	6.89
<b>EGC</b>	1.485	0.915
<b>EGCG</b>	269.16	135.96
<b>ECG</b>	0.46	0.198
<b>EC</b>	0.232	0.131

탈카페인 녹차에는 카페인 성분이 약 90% 제거된 것이 확인되었다. (탈카페인된 정도가 90% 이므로, 잔류 카페인 함량으로 표기하여 C10이라 명함). 그러나 그 외의 catechin 성분도 소실이 많아 탈카페인에 의한 녹차엽의 *in vitro* 안전성 및 기능성을 평가하기 위해서 모든 생리활성 실험에 사용된 탈카페인 녹차 추출물의 농도를 조정하여 비슷한 수준의 polyphenol 함량을 갖게 하였다.

#### 다. 총 폴리페놀 함량

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가지고 있다. 이들은 phenolic hydroxyl기를 가지고 있기 때문에 단백질 등의 거대 분자들과 결합하는 성질을 가지고 있으며 항산화, 항미생물 활성 효과 등의 생리활성을 가져 이에 녹차 및 탈카페인 녹차의 총 폴리페놀 함량을 측정하여 gallic acid의 함량으로 표현하였다. 실험 결과는 다음 Table 6.2와 같다.

Table 6.2. Total Polyphenol Content Assay(TP) from green tea(G) and decaffeinated green tea(D, C10) expressed as Gallic Acid Equivalents(GAE)

TP of G (g GAE/kg dry matter)	TP of D(C10) (g GAE/kg dry matter)
101.6 ± 1.6	72.1 ± 1.9

#### 라. Ferric reducing/antioxidant power assay

FRAP assay는 항산화력을 측정하는 방법으로  $Fe^{3+}$ -TPTZ가  $Fe^{2+}$ -TPTZ로 환원되는 것을 이용하여 측정된다. Benzie등은 이 방법에 대해 재현성이 쉽게 관찰되며 함유되어 있는 항산화제들이 농도에 직선적으로 비례하여 총 항산화 효과를 직접적으로 측정할 수 있다고 하였다. 녹차 열수



추출에서 FRAP assay에 의한 항산화력은 Table 6.3.과 같다. 전체 시료에 대한 FRAP 수치는  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도로 나타냈고 positive control로는 ascorbic acid를 사용하였다.

Table 6.3. FRAP Assay from green tea(G) and decaffeinated green tea(D, C10)

FRAP of G (mmol $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /g dry matter)	FRAP of D(C10) (mmol $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /g dry matter)
4.15 ± 0.06	2.91 ± 0.06

#### 마. DPPH radical 소거능

녹차의 열수추출물이 *in vitro* system에서 radical scavenging activity를 가지고 있는지를 알아보기 위해 수행한 실험이다. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)용액은 ascorbic acid, tocopherol과 방향족 화합물 등에 의하여 환원되어 짙은 자색이 탈색됨으로서 항산화 물질의 수소 공여능을 측정한다. 이 방법을 사용하여 녹차 및 탈카페인된 녹차의 radical 소거능을 비교하여 보았는데, 50% scavenging activity를 가지는 농도는 Table 6.4.와 같다. positive control로는 ascorbic acid를 사용하였다.

Table 6.4. DPPH Radical Scavenging Activity Assay from green tea(G) and decaffeinated green tea(D, C10)

DPPH · EC50 of G ( $\mu\text{g}$ dry matter/ml)	DPPH · EC50 of D(C10) ( $\mu\text{g}$ dry matter/ml)
102.02 ± 1.08	177.28 ± 0.96

EC50 : Amount of sample necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50%

#### 바. 총 Flavonoid 함량

Flavonoid는 생체 내에서 활성산소를 제거해주는 비효소계 항산화 물질 중의 하나이며 비영양소로 분류된다. 즉 Flavonoid를 함유한 식품들은 일중항 산소, 지질 과산화물 등 다양한 자유기들을 제거해 주는 항산화기능을 갖는다. 이 flavonoid 물질 중의 하나인 quercetin을 이용하여 표준 곡선을 그려서 열수 추출 녹차 및 탈카페인된 녹차의 flavonoid 함량을 Table 6.5.와 같이 나타내었다.

Table 6.5. Total Flavonoid Content Assay(TF) from green tea(G) and decaffeinated green tea(D, C10) expressed as Quercetin Equivalents(QE)

TF of G (g QE/kg dry matter)	TF of D(C10) (g QE/kg dry matter)
23.14 ± 2.06	42.07 ± 3.54

실제 녹차엽의 항산화 활성은 탈카페인 녹차 추출물의 농도가 보정된 값을 이용하였으므로, 일반 녹차에 비해 높게 나온 것을 짐작할 수 있다.

## 2. 일차 배양 시스템을 이용한 녹차 추출물의 간 보호능 측정

### 가. 간으로부터 간세포의 분리

Rat의 간으로부터 hepatocyte의 분리는 2단계의 collagenase perfusion 방법 (Seglen, 1976)으로 Bissel과 Bonny 등의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. Rat을 ketamine hydrochloride와 xylazine hydrochloride(1:2)의 혼합액으로 마취시킨 후 perfusion medium(25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM KCl, 120mM NaCl, 11 mM glucose, 5 mg/L phenol red, 10% BSA) 200 ml을 20 ml/min의 유속으로 간 문맥에 약 7분간 관류시키고, 0.05% Type I collagenase, 4 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mg trypsin inhibitor의 pH 7.5 perfusion medium을 13 ml/min분의 유속으로 7분 30초 동안 처리하였다. Collagenase의 작용이 끝난 간을 쥐로부터 분리한 후, nylon mesh를 이용하여 washing medium(L-15 medium, 18 mM HEPES, 0.2% BSA, 0.05% glucose, 5 µg/ml insulin)으로 분리, 세척한다(Alpini G *et al*, 1994). 세포 현탁액을 원심분리(500 rpm, 3 min.)하여 상등액은 제거하고 cell pellet에 Percoll 용액을 처리한 후 0.4% trypan blue와 세포현탁액을 희석하여 세포수를 계산한다. 37°C incubator에서 세포가 collagen coating된 배양 용기 표면에 부착하도록 4시간 배양 후 plating media를 취하여 20시간 후, 각각의 시료를 처리한다.

Cell density는 24 well에  $1.8 \times 10^5$  cells/well, 100 mm<sup>2</sup>은  $5.0 \times 10^6$  cells/well을 원칙으로 한다.

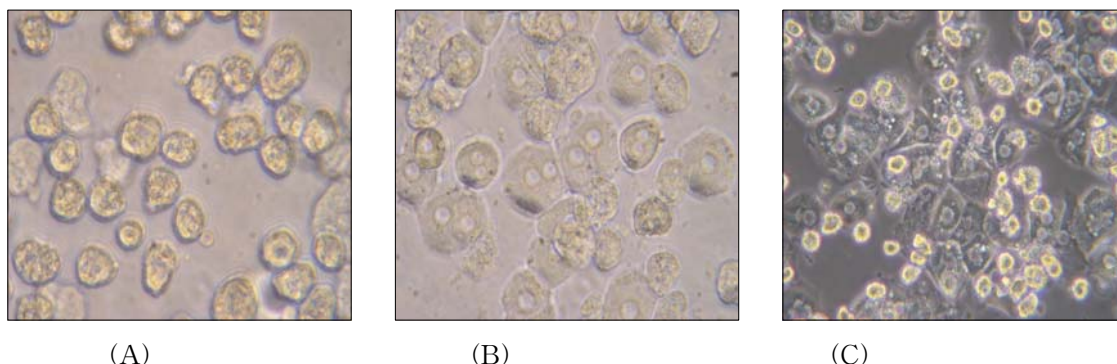


Fig. 6.1. Primary cultured hepatocytes from Sprague-Dawley rats.

(A) right after seeding, (B) 4hr after seeding, (C) 24hr after seeding (40X)

나. 세포 생존율 측정

MTT assay는 노란색의 가용성 tetrazolium염이 살아있는 세포의 미토콘드리아에 의해 파란색의 불용성 formazan 생성물로 환원되는 원리를 이용한 실험이다. 따라서 살아있고 대사적으로도 왕성한 세포의 농도를 흡광도 값으로 반영하여 세포 생존율을 측정할 수 있다.

녹차 추출물과 탈카페인 녹차 추출물을 농도별로 처리하였을 때의 세포 생존율과 간 독성을 유발하는 negative control로 잡은 allyl alcohol (농도 25  $\mu$ M)을 함께 처리하였을 때의 세포 생존율 향상을 함께 측정하였다.

일반 녹차는 농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 증가하며, 이 같은 경향은 탈카페인 녹차에도 해당이 된다. 특히 allyl alcohol과 함께 처리시 농도에 따라 저해 효과가 큰 것을 볼 수 있다. Fig. 6.2.은 녹차와 탈카페인 녹차 추출물을 처리한 동시에 비교한 것이다. 탈카페인 된 녹차 추출물이 일반 녹차에 비해 통계적 유의차는 보이지 않으나 세포의 생존율을 약 14% 증강시킨다는 것을 볼 수 있다.

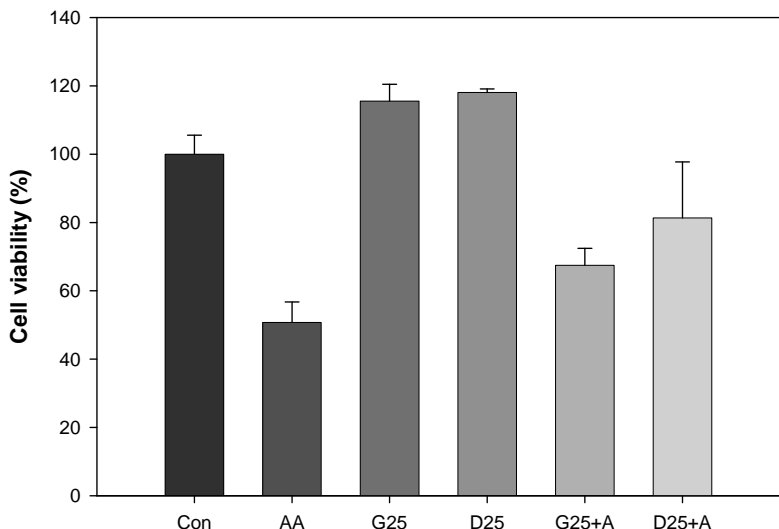


Fig. 6.2. Cell viability compared to control group treated for 2 hr with green tea and decaffeinated green tea.

Con : control, AA : allyl alcohol 2.5  $\mu$ M, G25 : green tea 25  $\mu$ g/ml, G25+A : G 25  $\mu$ g/ml + A 2.5  $\mu$ M, D25 : D 25  $\mu$ g/ml, D25+A : D25  $\mu$ g/ml + A 2.5 $\mu$ M

\* significantly different from control by T-test (P < 0.05).

Lactate dehydrogenase(LDH)는 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)를 조효소로 사용하여 pyruvate와 L-lactate 사이의 산화, 환원 반응에 관여하는 해당효소의 일종이다. 이 반응은 NADH가 감소되면서 젖산(lactic acid)과 NAD+가 생성되는 원리를 이용한 것이다. 즉, 산

화 스트레스에 의한 다량의 과산화물이 생성되면 세포막을 손상하여 세포의 LDH 유출이 증가되기 때문에 LDH activity는 세포막 integrity의 지표로 사용된다. Fig. 6.3.을 보면 MTT assay와 같은 경향을 나타낸다는 것을 알 수 있다. LDH activity가 높아진다는 것은 그만큼 세포막 손상이 많이 일어났다는 것을 뜻한다.

대조군에 비해 간 독성을 유발하는 물질인 allyl alcohol을 처리하였더니 약 3배 정도의 LDH 유출이 더 증가하였으며, 탈카페인 녹차는 일반 녹차에 비해 allyl alcohol과 함께 처리 시 LDH 유출을 2% 가량 저해시켰다. 또한 일반 녹차만 처리하였을 때에도 탈카페인 녹차가 LDH 유출을 약 23% 저해시켰다.

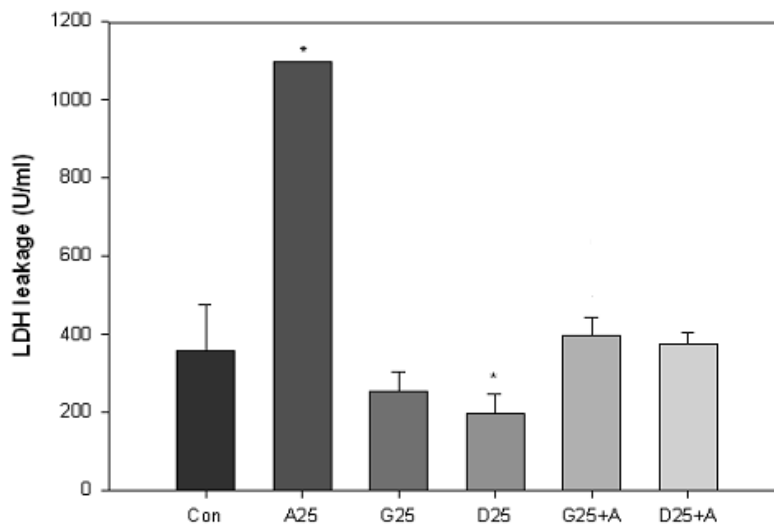


Fig. 6.3. LDH leakage by treatment for 2 hr of green tea(T) & decaffeinated green tea(D, C10)

Con : control, A25 : allyl alcohol 2.5 $\mu$ M, G25 : green tea 25  $\mu$ g/ml, D25 : decaffeinated green tea 25 $\mu$ g/ml, G25+A : G 25  $\mu$ g/ml + A 2.5 $\mu$ M, D25+A : D 25  $\mu$ g/ml + A 2.5 $\mu$ M

\* significantly different from control by t-test (P<0.05)

#### 다. 과산화지질 생성

이 실험은 세포막 손상 정도와 관련된 것으로 세포 내 ROS(reactive oxygen species)가 발생하면 인지질막에 다량 함유되어 있는 불포화지방산 수소원자를 제거하게 된다. 이로써 지질과산화의 연쇄반응이 유발되고 지방산 사슬에서 peroxy radical과 alkoxy radical이 생성된다. 이것들은 수소원자와 결합하여 lipid hydroperoxide를 생성하는데 이는 분해되어 malondialdehyde(MDA) 등의 aldehyde를 생성한다. 이렇게 생성된 지질과산화물은 세포막의 투과성을 증가시키고 체액의 손실을 일으켜 단백질 변화를 유발한다. 이는 암이나 동맥경화, 고혈압 등의 각종 질병을 일으킬 수 있다. 본 실험에서는 TBARS 법에 의해 지질과산화의 생성지표인 malondialdehyde(MDA)를 측정해보았다. TBARS 법에서는 Thiobarbituric acid와 불포화지방산이 반응하여 malondialdehyde를 생성하며 이것은 붉은 빛을 띠게한다. 이 붉은 빛을 띠는 물질을 excitation 515 nm/emission 552 nm에서

측정한다.

처리 group은 control과 allyl alcohol 25  $\mu$ M, 녹차 25  $\mu$ g/ml, 탈카페인 녹차 25  $\mu$ g/ml, 녹차 25  $\mu$ g/ml과 allyl alcohol 25  $\mu$ M을 같이 처리한 group, 탈카페인 녹차 25 $\mu$ g/ml과 allyl alcohol 25  $\mu$ M을 같이 처리한 group으로 나누어진다. Ally alcohol은 간 독성을 일으키는 물질로 acrolein을 생성한다. 카페인을 allyl alcohol에 의한 간독성에 관여되어있다고 본다.

실험 결과 ally alcohol 처리한 group은 control group보다 lipid peroxidation을 많이 일으켰다. 그리고 녹차 25  $\mu$ g/ml과 탈카페인 녹차 25  $\mu$ g/ml을 추출한 group 모두 MDA(Malondialdehyde) 생성을 감소시켰다. 특히 탈카페인 녹차 25  $\mu$ g/ml을 처리하였을 때는 control 대비 약 40 % 정도의 MDA 생성을 감소시킨다. 이 수치는 녹차 25  $\mu$ g/ml group보다 0.3% 감소시킨 수치이다. 그리고 allyl alcohol과 함께 처리하였을 때에는 allyl alcohol만 처리한 group보다 MDA 생성을 50% 정도 감소시켜준다. 그리고 그 효과는 탈카페인 녹차가 일반적인 녹차보다 MDA 생성 억제능이 1.1 배 강하다.

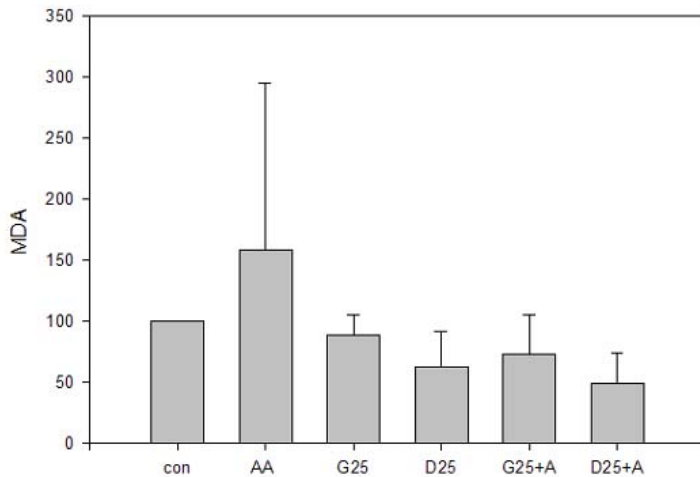


Fig. 6.4. TBARs assay by treatment for 2 hr of green tea and decaffeinated green tea

Con : control, AA : allyl alcohol 2.5 $\mu$ M, G25 : green tea 25  $\mu$ g/ml, D25 : decaffeinated green tea 25 $\mu$ g/ml, G25+A : G 25  $\mu$ g/ml + A 2.5 $\mu$ M, D25+A : D 25  $\mu$ g/ml + A 2.5 $\mu$ M

\* significantly different from control by t-test (P<0.05)

#### 라. CYP1A mRNA level 측정

간의 여러 가지 중요한 역할 중의 하나가 해독작용을 하는 것이다. 간에 어떠한 독성물질이 침투하였을 때, 해독작용을 거치면서 Cytochrome P450 (CYP450)이라는 효소가 발현하게 된다. 이 효소가 여러 유독물질을 대사시켜 유독하지 않은 물질로 만들기 때문에 CYP450 효소가 어느 정도 발현되어 있는지를 살펴보는 것은 간에 존재하는 독성물질의 정도를 살펴볼 수 있는 지표라 할 수 있겠다. 본 실험은 CYP450의 mRNA level을 측정하였다. mRNA level을 측정하는 이유는 무엇보다도 단백질을 만드는 ,즉 CYP450 효소로서 작용할 수 있는 물질을

만들어내는 것이기 때문이다.

우리 실험 방법으로 녹차 추출물이나 탈카페인 녹차 추출물을 처리한 hepatocyte에서는 CYP450 효소 발현에는 차이가 거의 없었다.

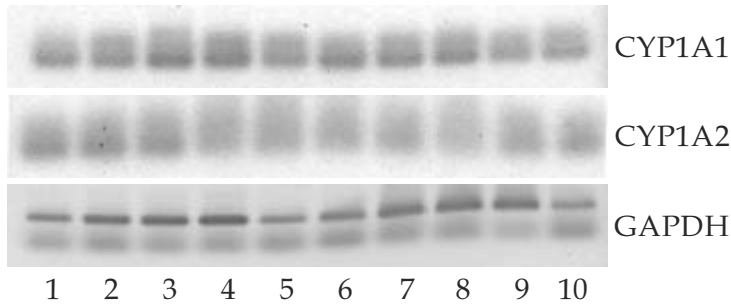


Fig. 6.5. mRNA expression level of CYP450

1: con, 2: Allyl alcohol 25  $\mu$ M, 3: G 25  $\mu$ g/ml, 4: G 25  $\mu$ g/ml +A 25  $\mu$ M 5: D 25  $\mu$ g/ml, 6: D 25  $\mu$ g/ml+A 25  $\mu$ M 7: G 100  $\mu$ g/ml, 8: G 100  $\mu$ g/ml+A 25  $\mu$ M, 9: D 100  $\mu$ g/ml, 10: D 100  $\mu$ g/ml+A 25  $\mu$ M

#### 마. EROD (CYP1A1) / MROD (CYP1A2) 효소 활성 Assay

앞서 실험한 RT-PCR의 결과는 mRNA level을 보여주는 것이라면, 본 실험은 mRNA가 실질적으로 얼마나 단백질 즉, 효소로 변화가 되었는지 보여줄 수 있다. CYP1A1은 EROD(7-ethoxyresorufin O-deethylase)라는 효소를 생성하고, CYP1A2는 MROD(methoxyresorufin O-demethylase)를 각각 생성한다. 따라서 이러한 효소의 측정은 간에서의 특정 독성물질의 해독이 얼마나 진전되고 있는지를 알려주는 지표라 할 수 있다. CYP 1A1과 CYP 1A2는 생체 이물질의 산화와 환원 및 수화작용을 일으키는 효소이다. 이를 통해 이물질의 작용기를 conjugation 결합이 일어나기 쉽게 만들어 준다. Conjugation 결합은 이물질이 신장이나 담즙산이 이물질 제거를 용이하게 해준다. 전체적인 해독 과정을 보면 CYP 1A1과 CYP 1A2는 필수불가결한 효소이지만 부분적인 역할을 보면 항상 긍정적인 부분만 있는 것은 아니다. 왜냐하면 CYP 1A1과 CYP 1A2는 발암 원인 물질을 활성화시켜 암을 일으킬 수도 있기 때문이다. 여러 논문에서 산화를 일으키는 물질과 CYP 1A1, CYP 1A2 활성의 관계에 대해서 조사하였는데, 간 독성을 일으키거나 산화 작용을 하는 많은 화합물이 CYP 1A1과 CYP 1A2의 활성을 증가시킨다는 결과가 나왔다.. 예를 들어 산화 작용을 하는 대표적인 물질인 tert-butyl hydroperoxide의 존재하여서는 CYP 1A2, CYP 1A2의 활성이 활발해진다. 이 실험에서도 간 독성을 일으키는 물질인 ally alcohol을 negative 대조군으로 두어서 녹차와 탈카페인 녹차가 CYP 1A1과 CYP 1A2 활성에 미치는 영향을 조사하였다. CYP 1A1과 CYP 1A2는 해독작용 처리 group은 control group과 liver damage를 유발하는 allyl alcohol(AA) 25  $\mu$ M을 처리한 group, 녹차 25  $\mu$ g/ml을 처리한 group, 녹차 25  $\mu$ g/ml + A, group, 탈카페인 녹차 25  $\mu$ g/ml,, 탈카페인 녹차 25  $\mu$ g/ml+A group이 있다. 밑의 그래프는 녹차와 탈카페인 녹차를 농도별로 처리하여 EROD와 MROD activity를 측정 한 결과를 나타내고 있다. 녹차를 25  $\mu$ g/ml의 농도로 처리하였을 경우와 탈카페인 녹차를 25  $\mu$ g/ml 농도로 처리한 경우를 비교하면 탈카페인 녹차가 일반적인 녹차보다 약 50%정도 CYP 1A1

의 활성을 억제시켜주고 있다. 게다가 ally alcohol과 함께 처리하였을 때도 유의적으로 녹차와 탈카페인 녹차 사이에서의 차이점이 발견되고 있어, 탈카페인 녹차의 CYP 1A1 활성 억제능이 입증되었다.

CYP 1A2의 경우도 ally alcohol 처리군과 비처리군 사이에서 녹차와 탈카페인 녹차 사이에 유의적인 차이가 있다고 입증되었다. 즉, 탈카페인 녹차가 ally alcohol 처리군과 비처리군 모두에서 CYP 1A2의 활성을 억제시켜 준다.

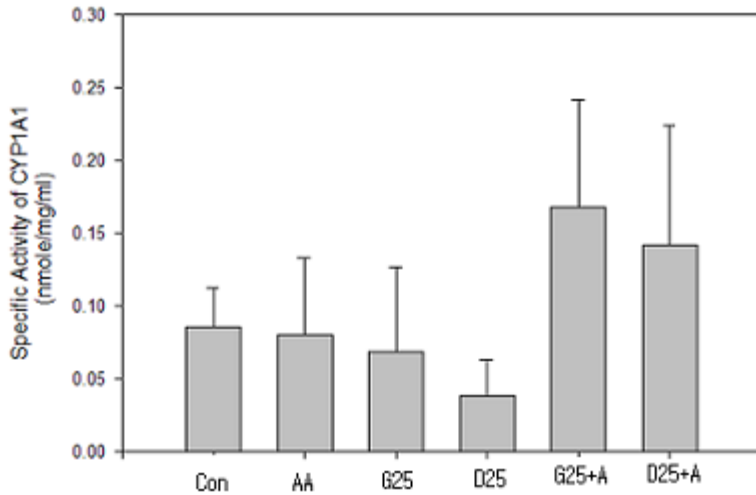


Fig. 6.6. EROD(7-ethoxyresorufin O-demethylase) assay

Con : control, AA : allyl alcohol 2.5 $\mu$ M, G25 : green tea 25  $\mu$ g/ml, D25 : decaffeinated green tea 25 $\mu$ g/ml, G25+A : G 25  $\mu$ g/ml + A 2.5 $\mu$ M, D25+A : D 25  $\mu$ g/ml + A 2.5 $\mu$ M

\* significantly different from control by t-test (P<0.05)

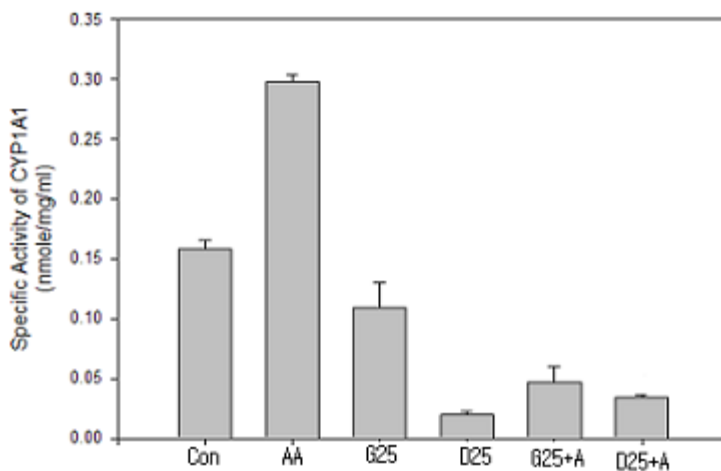


Fig. 6.7. MROD(methoxyresorufin O-demethylase) assay

Con : control, AA : allyl alcohol 2.5 $\mu$ M, G25 : green tea 25  $\mu$ g/ml, D25 : decaffeinated green tea 25 $\mu$ g/ml, G25+A : G 25  $\mu$ g/ml + A 2.5 $\mu$ M, D25+A : D 25  $\mu$ g/ml + A 2.5 $\mu$ M

\* significantly different from control by t-test (P<0.05)

### 3. 신경아세포종 SH-SY5Y 세포를 이용한 세포독성 및 항산화 활성

녹차와 탈카페인 녹차 추출물이 세포 특이적으로 영향을 미치는 지를 알아보기 위하여 신경아 세포종인 SH-SY5Y 세포를 이용하여 세포 생존율, 과산화지질 생성을 측정하였다.

#### 가. SH-SY5Y 세포의 세포 생존율

SH-SY5Y 세포에 대해 특이적인 조건(allyl alcohol의 농도는 1M, 추출물처리 시간은 30분으로 조건을 달리함)을 새롭게 하여 Fig. 2-8.에서 보는 것과 같이 MTT assay를 통해서 Hepatocyte에서 녹차와 탈카페인 녹차 추출물을 처리하였을 때에는 농도별에 따른 세포 생존율이 증가하는 것을 볼 수 있었으나, SH-SY5Y 세포는 각각 30분 동안 처리하였을 때 전혀 다른 경향을 보였다. 신경아세포종에서는 녹차와 탈카페인 추출물의 농도가 낮을수록 오히려 더 높은 생존율을 보였으며, 또한 negative control로 잡은 allyl alcohol의 농도, 1M와 함께 30분간 처리하였을 때에는 탈카페인 녹차의 추출물을 처리한 것이 대조군에 비교하여 약 1% 정도 낮춰주는 미미한 효과를 보였다.

이와 같은 결과에 비추어 녹차와 탈카페인 녹차 추출물이 세포에 특이적으로 영향을 미친다는 것을 미루어 짐작할 수 있다.

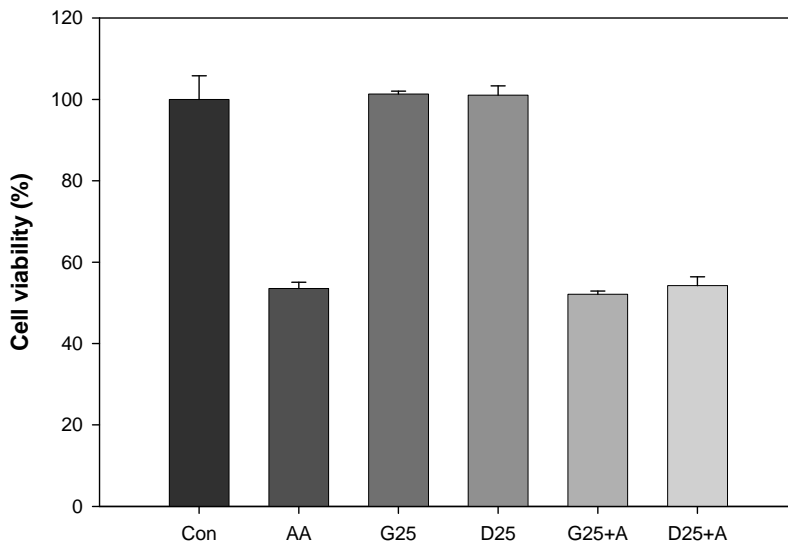


Fig. 6.8. Cell viability compared to control group, depending on the concentration of green tea & decaffeinated green tea for 30 min.

Con : control, AA : allyl alcohol 1M, G25 : green tea 25 µg/ml, D25 : decaffeinated green tea 25µg/ml, G25+A : G 25 µg/ml + A 1M, D25+A : D 25 µg/ml + A 1M

\* significantly different from control by t-test (P<0.05)



실험방법은 앞서 설명한 방법과 동일하며, Fig. 6.9.를 보면 녹차 추출물을 처리하였을 때보다 탈카페인 녹차 추출물을 처리하였을 때의 LDH 유출이 약 67%정도 줄어드는 것이 확인되었다. 또한 독성물질 allyl alcohol, 1M을 반시간 동안 동시에 처리하였더니 탈카페인된 녹차 추출물이 약 44% 정도 항산화활성이 더 높은 것으로 확인되었다.

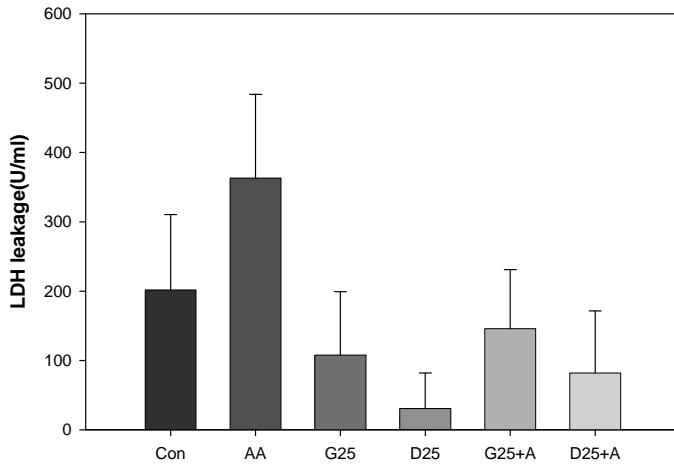


Fig. 6.9. LDH leakage by treatment for 30 min. of green tea(T) & decaffeinated green tea(D, C10)

Con : control, AA : allyl alcohol 1M, G25 : green tea 25 µg/ml, D25 : decaffeinated green tea 25µg/ml, G25+A : G 25 µg/ml + A 1M, D25+A : D 25 µg/ml + A 1M

\* significantly different from control by t-test (P<0.05)

#### 나. 과산화지질 생성

실험방법은 앞서 설명한 방법과 동일하며, 생성된 지질과산화물의 생성지표인 malondialdehyde(MDA)를 형광측정기기로 excitation 515 nm/emission 552 nm에서 측정한다.

Fig. 6.10.에서 보면 처리 group은 control과 allyl alcohol 1M, 녹차 25 µg/ml, 탈카페인 녹차 25 µg/ml, 녹차 25 µg/ml과 allyl alcohol 1M을 같이 처리한 group, 탈카페인 녹차 25µg/ml과 allyl alcohol 1M을 같이 처리한 group으로 나누어진다.

실험결과를 분석하였을 때, 녹차 추출물과 탈카페인 녹차 추출물을 처리한 것이 대조군과 유의적으로 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한, allyl alcohol 1M과 함께 처리되었을 때에는 일반 녹차 추출물은 약 29%, 탈카페인 녹차 추출물을 처리하였을 때에는 약 31% 정도 MDA 생성이 줄어들었다.

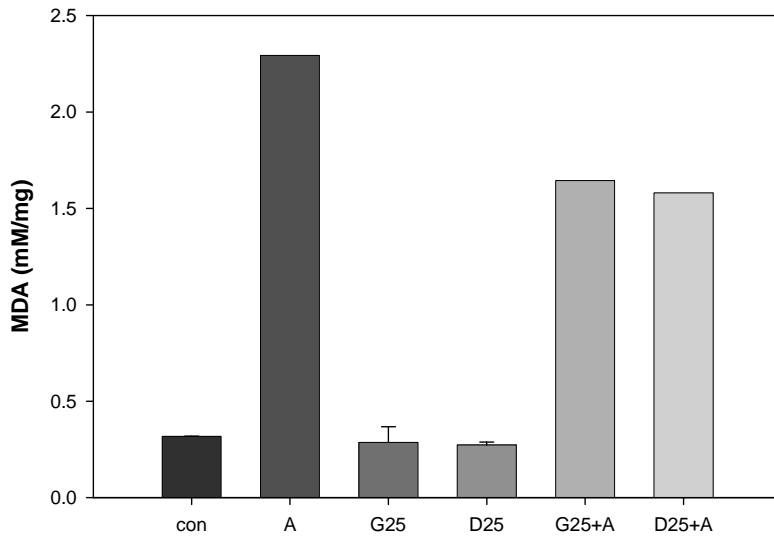


Fig. 6.10. TBARs assay by treatment for 30 min. of green tea and decaffeinated green tea. Con : control, AA : allyl alcohol 1M, G25 : green tea 25  $\mu$ g/ml, D25 : decaffeinated green tea 25 $\mu$ g/ml, G25+A : G 25  $\mu$ g/ml + A 1M, D25+A : D 25  $\mu$ g/ml + A 1M  
 \* significantly different from control by t-test ( $P < 0.05$ )

#### 4. Ames test를 통한 돌연변이원성 예방 효능 평가

본 시험은 살모넬라균(*Salmonella typhimurium*) 또는 대장균(*Escherichia coli*)을 이용한 유전자 돌연변이시험이다. 전자에서는 histidine 요구성의 변이(his $\rightarrow$ His+), 후자에서는 tryptophan 요구성의 변이(trp $\rightarrow$ Trp+)를 지표로 하고 있다. 이러한 균주는 DNA 손상의 수복기능이 결손되어 있고 자외선 또는 각종 유전독성유발물질에 대해 높은 감수성을 나타낸다. 시험물질의 성질에 따라서는 대사활성화에 의해 비로소 유전독성을 나타내는 것이 있음이 알려져 있으므로 상기시험에서는 rat의 간장으로부터 조제한 microsomal enzyme을 포함하는 분획(S9)을 가한 계와 가하지 않은 계를 병행하여 시행한다.

##### 가. 시험균주의 선택

본 시험에서는 보통 복수의 균주를 이용한다. 살모넬라균주 (TA1535, TA98, TA100)에서는 표적으로 하는 histidine 유전자의 G-C(guanine-cytosine) 염기쌍의 변화가 검출될 수 있다. 본 실험에서는 다음 3 균주를 사용하였다.

- 1) TA98
- 2) TA100
- 3) TA1535

나. 시험방법 및 결과

녹차 추출물과 탈카페인 녹차 추출물을 동결건조 하여 멸균증류수를 이용하여 적절하게 용해시킨 뒤에 0, 100, 500, 1000, 2000, 5000 $\mu$ g/plate의 농도로 처리하였다. Ames test를 위해서 먼저 100mm plate에 최소 글루코오즈 한천배지를 균혀놓고 상층 한천 배지와 균주, 시험물질과 buffer 또는 S9 혼합액을 잘 섞어 plate에 붓고 고르게 펼친 후에 굳힌다. 본 시험은 음성 및 양성 대조균을 두게 되는데 음성 대조균에는 원칙적으로 용매만을 가함. 양성 대조균에는 시험 균주의 종류에 따라, 또한 대사활성화의 유무에 따라 적절한 유전독성유발 물질을 이용하였다. 본 시험에서는 다음과 같은 유전독성유발물질을 사용하였다.

시험균주의 종류	화학물질명	
살모넬라균	TA1535	NaN3
	TA98	2-NF
	TA100	NaN3

시험균주의 종류	화학물질명	
살모넬라균	TA1535	2-AA
	TA98	2-AA
	TA100	2-AA

NaN3 : sodium azide  
 2 NF : 2-nitrofluorene  
 9 AA : 9-aminoacridine

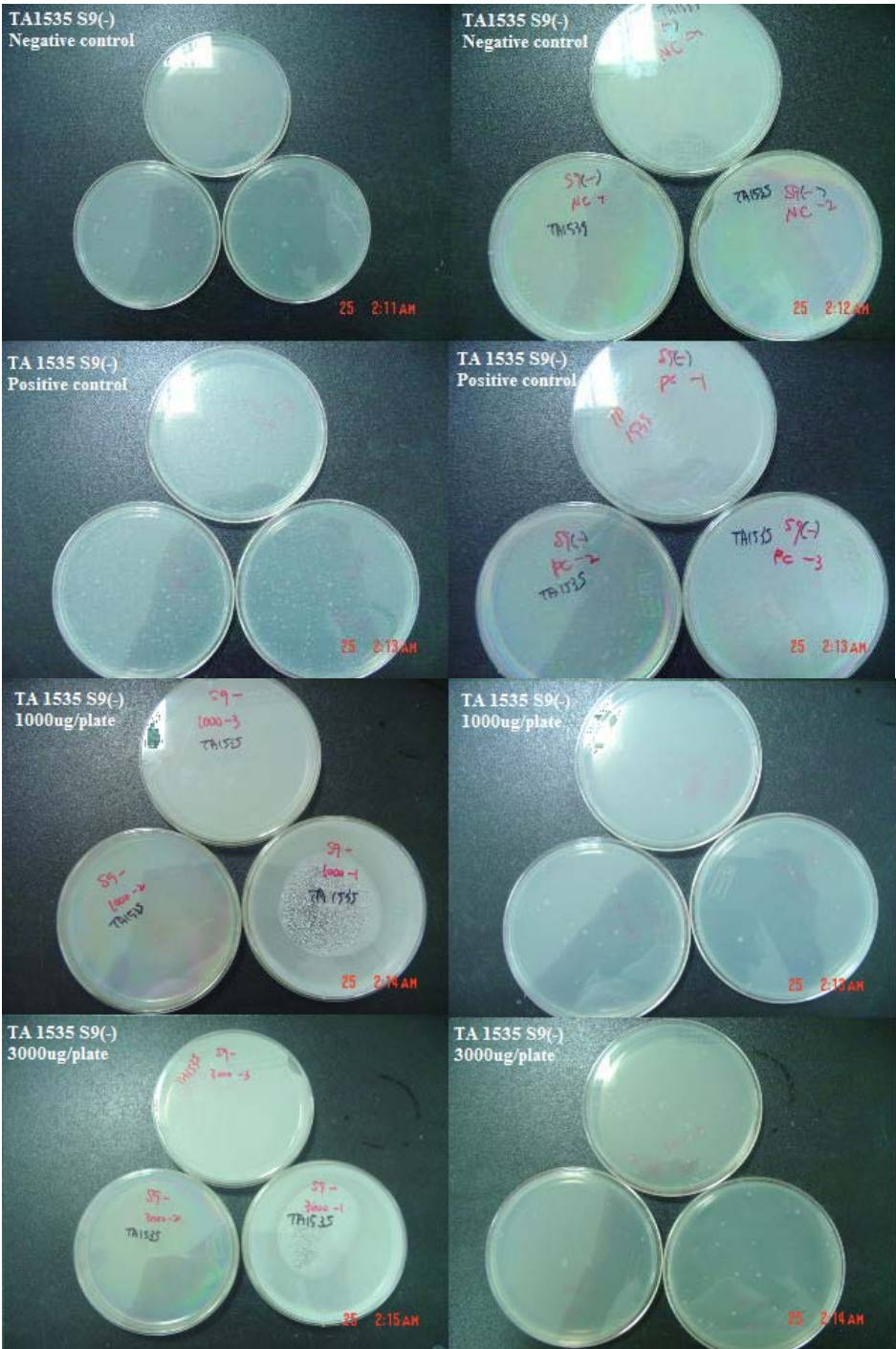
상층 한천배지를 굳힌 후에 48시간 동안 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 배양한 후에 colony의 수를 세어 복귀돌연변이를 일으키는지 여부를 판단하였다. 대사활성계 존재 유, 무에 관계없이 최소 1개 균주에서 플레이트 당 복귀된 colony수에 있어서 1개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정하였다.

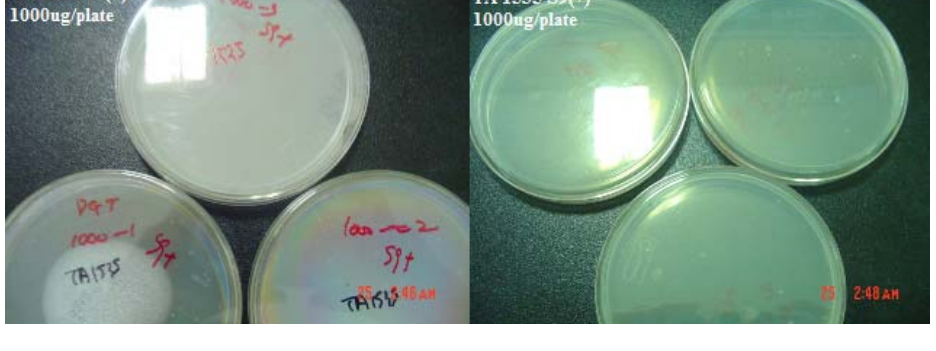
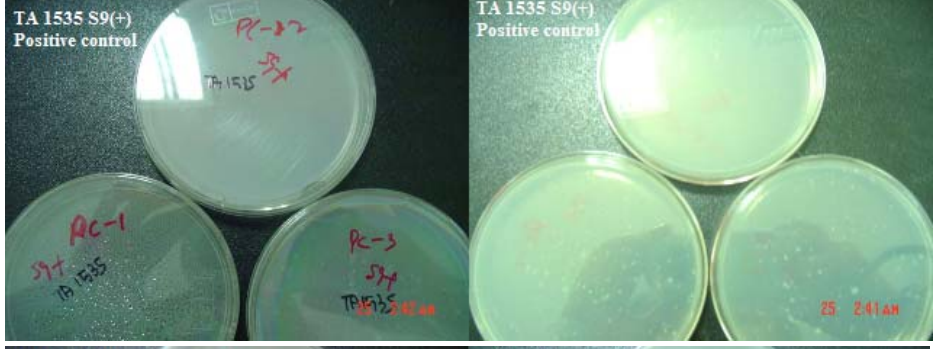
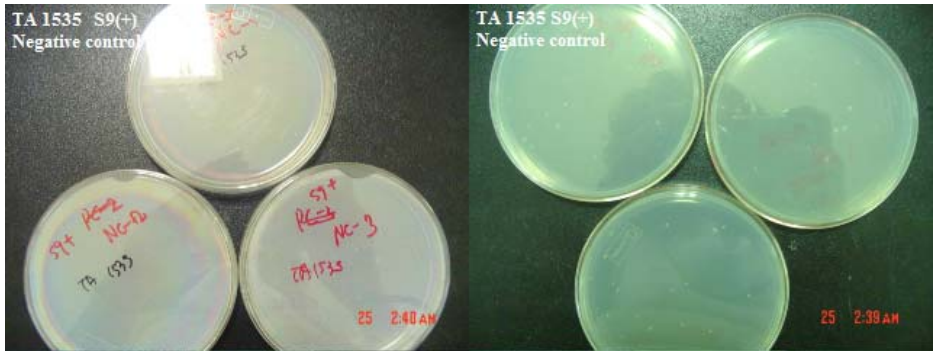
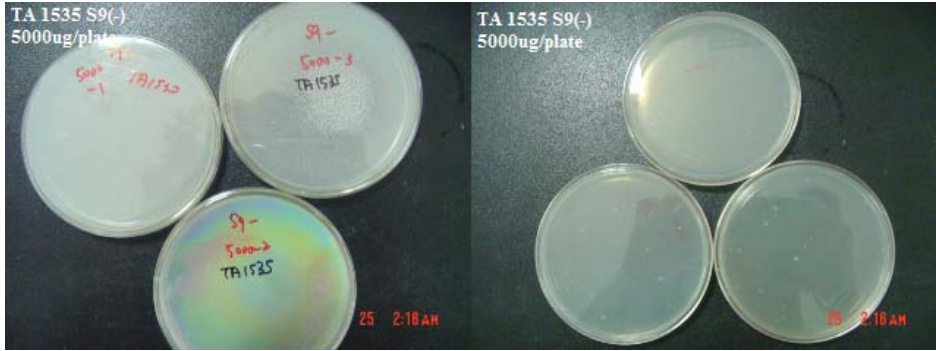
① TA 1535

TA 1535 Colony 수	S9 (-)		S9 (+)	
	평균	표준편차	평균	표준편차
Negative Control	37.3	13.5	30.5	2.1
Positive Control	708.3	45.4	148.7	70.0
DGT 1000 ug	30	9.6	36.7	15.9
DGT 3000 ug	35.7	10.8	25.7	7.1
DGT	24.7	3.0	31	7.8

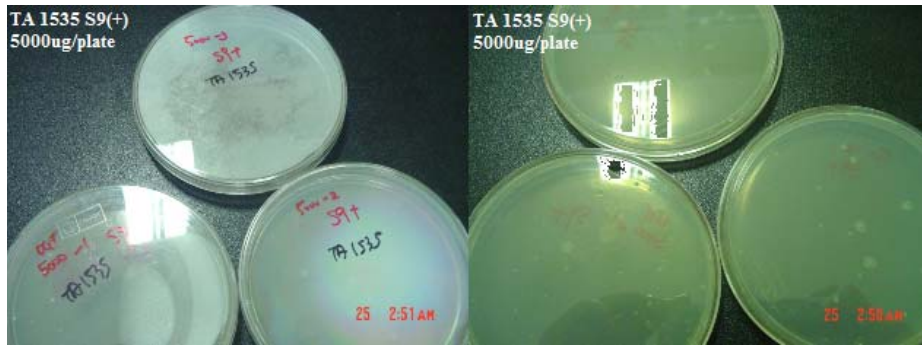
5000 ug				
---------	--	--	--	--

< TA 1535 결과 사진 >





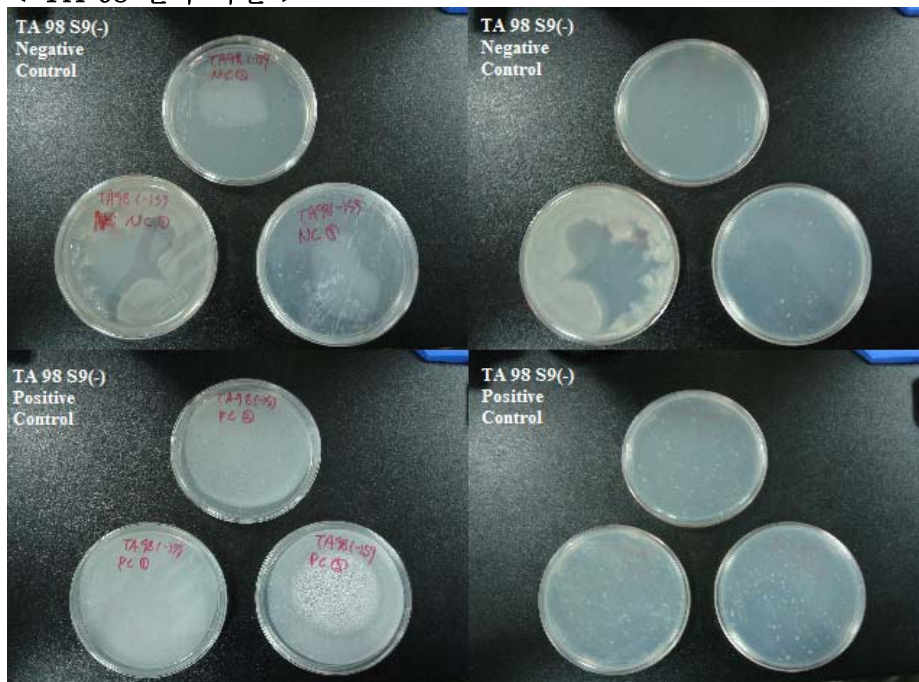


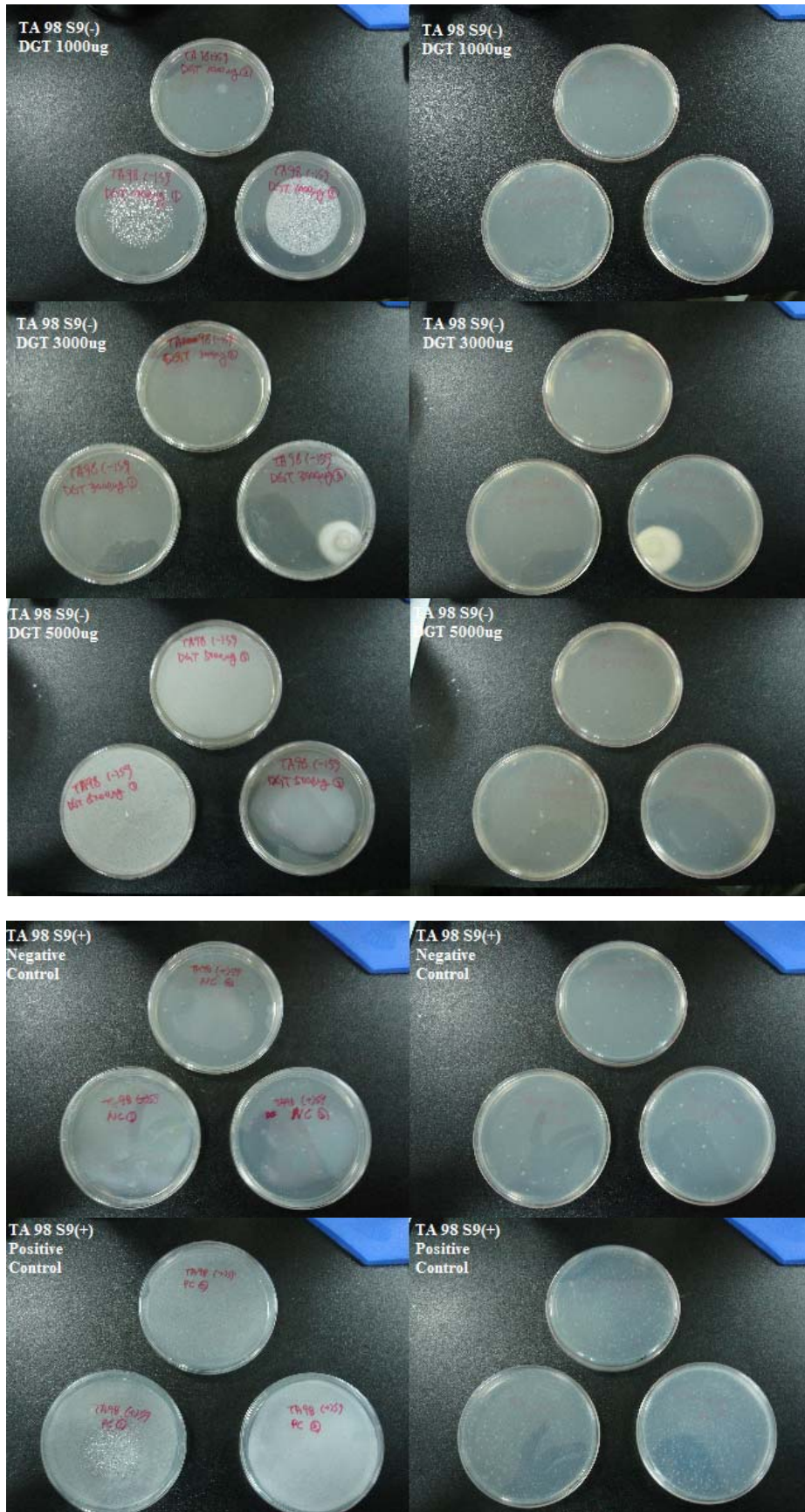


② TA 98

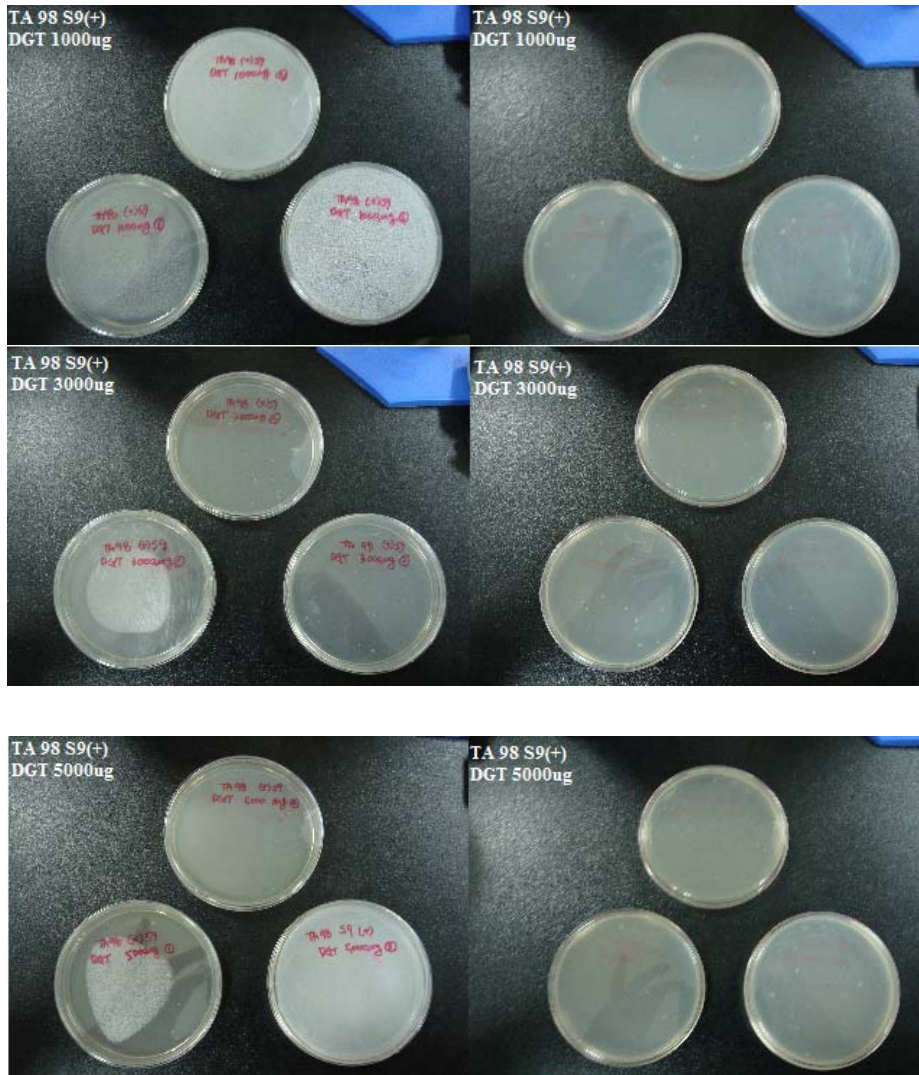
TA 98	S9 (-)		S9 (+)	
Colony 수	평균	표준편차	평균	표준편차
Negative Control	197.0	8.7	133.3	3.1
Positive Control	855.7	43.1	2680.7	449.1
DGT 1000 ug	204.7	32.6	204.7	32.6
DGT 3000 ug	182.3	18.0	182.3	18.0
DGT 5000 ug	158.3	24.0	158.3	24.0

< TA 98 결과 사진 >







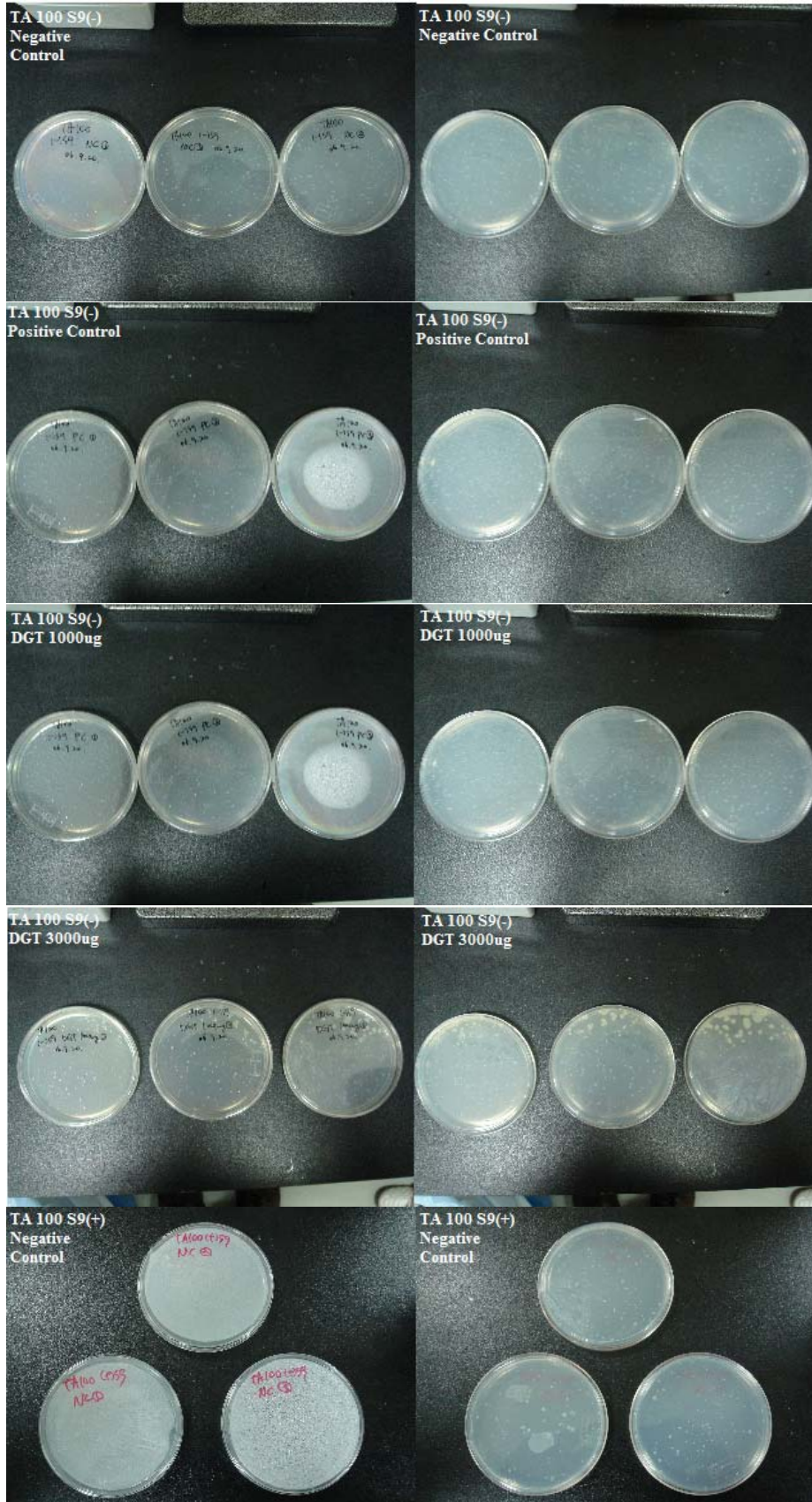


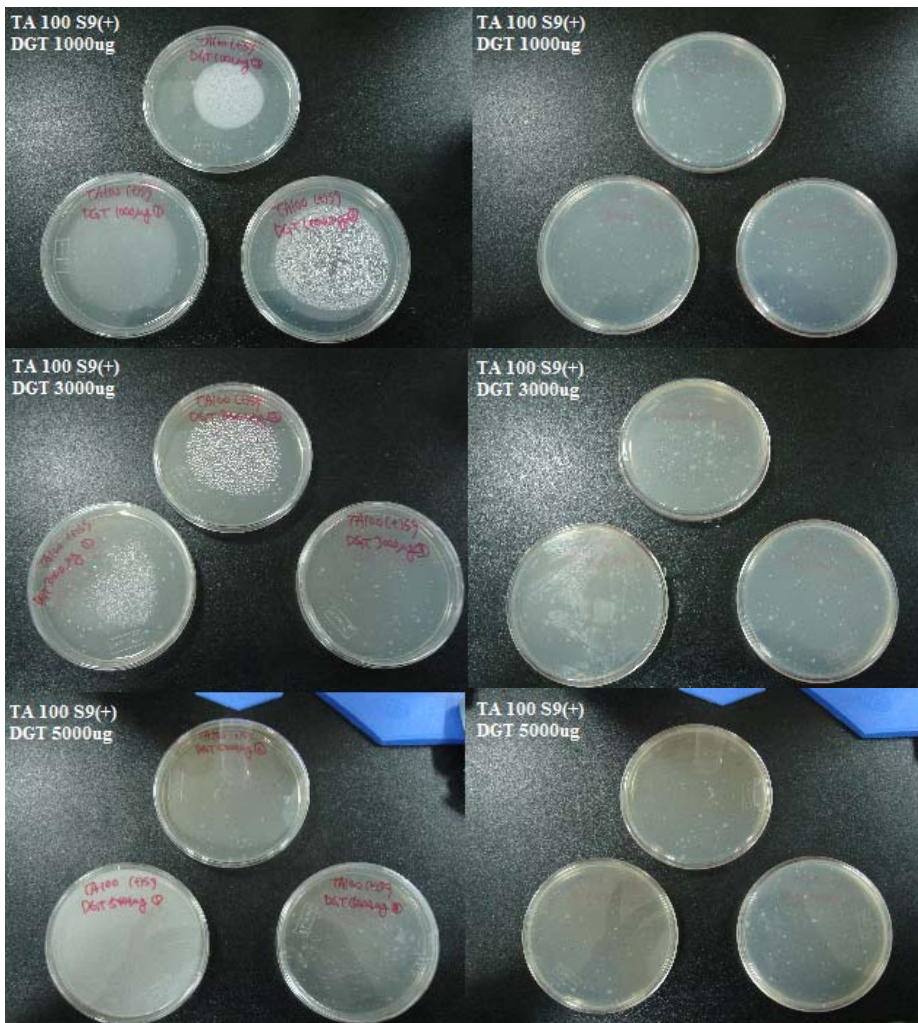
③ TA 100

TA 100 Colony 수	S9 (-)		S9 (+)	
	평균	표준편차	평균	표준편차
Negative Control	31.0	11.3	51.7	3.5
Positive Control	503.7	67.0	1496.7	41.5
DGT 1000 ug	29.3	1.2	30.7	10.4
DGT 3000 ug	33.3	4.9	32.7	4.9
DGT 5000 ug	31.3	4.0	36.0	9.5

< TA 100 결과 사진 >







## 5. 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

본 시험은 사람 및 포유류의 배양세포를 이용하여 화학물질의 염색체이상 유발성 유무와 유발 정도를 검색하는 시험이다. 염색체이상(chromosome aberration)은 염색체수의 변화(이수성 aneuploidy, 배수성 polyploidy)와 형태의 변화(구조이상)로 구분된다. 수적이상은 주로 분열장치에 작용하여 생기는 염색체의 불분리 또는 분열정지에 기인한다.

한편, 구조이상(structural aberration)은 일반적으로 DNA 이중쇄 절단(double strand breaks)에 기인한다고 알려져 있다. 이러한 이상을 유발하는 성질을 가진 물질을 특별히 clastogen으로 부르기도 한다. 수적이상과 구조이상이 유발된 세포의 대부분은 증식되지 않고 사멸하는 것으로 생각되고 있지만 생존한 경우에는 정상과 다른 염색체구성(염색체변이)을 가진 세포집단으로 이행될 가능성이 있다.

세포는 Chinese hamster 세포주(CHL)를 이용한다. Chinese hamster 세포주는 동일한 세포계를 반복하여 사용할 수 있고, 염색체의 수가 적고 커서 관찰이 용이한 점, 증식이 빠르고 비교적 간단한 배양액을 사용할 수 있는 점과 S9 mix에 의한 대사활성화가 용이한 장점을 가지고 있다.

본 시험에서는 CHL에 녹차 추출물과 탈카페인 녹차 추출물을 동결건조 하여 멸균증류수를 이용하여 용해시킨 후에 적절한 농도로 희석하여 처리하였다. 예비시험 결과 녹차 추출물과 탈카페인 녹차 추출물에서는 세포독성을 나타내지 않는 것으로 판단되었기 때문에 최고농도를 5 mg/ml 으로 하여 3개 농도로 희석하여 시험하였다.

음성대조는 원칙적으로 용매대조로 하지만, 용매를 가하지 않는 무처리군 세포에 대하여 용매가 어떤 영향도 미치지 않음을 확인할 필요가 있다. 양성대조에는 대사활성화의 유무에 대응하는 적절한 기지의 염색체이상 유발물질을 이용한다.

Table. 6.6. 염색체이상시험을 위한 양성대조물질의 예

대사활성화의 유무	화학물질명
S9 mix를 가하지 않는 경우	Mytomycin C MNNG MMS
S9 mix를 가하는 경우	B(a)P DMBA Cyclophosphamide(CPA) DMN

MNNG : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

MMS : methylmethane sulfonate

B[a]P : benz[a]pyrene

DMBA : dimethylbenzanthracene



DMN : dimethylnitrosamine

세포를 이용한 복귀돌연변이시험과 같이 원칙적으로 rat의 간장으로부터 조제한 S9를 이용한다. S9 자체에 독성 또는 염색체이상 유발성이 있다는 보고도 있으므로 적절한 농도(최종농도로서 5%선)에서 단시간 작용시켜야 한다. S9는 보호소 등을 가하여 S9 mix로 조제하여 사용한다. 대사활성화법에서는 세포를 부유 상태로 또는 세포를 단층배양상태로 시험물질과 S9 mix를 수 시간(3~6시간) 처리한다. 처리 후 세포를 세정하고 약 1.5 세포주기 동안 새로운 배양액으로 증식시킨 후 염색체표본을 제작한다.

증식기에 있는 세포에 시험물질을 가하고 적절한 시기에 염색체 표본을 제작한다. 연속처리법으로 대사활성화를 병용하지 않는 경우에는 약 1.5 세포 주기에 걸쳐 시험물질을 작용시킨다. 세포독성에 의한 세포주기의 연장이 현저히 관찰되는 경우에는 좀 더 장시간의 처리가 요구된다. 염색체의 구조이상은 통상, 처리 후 제 1회 분열중기에 출현하는 경우가 많으나 염색체수의 이상 특히, 배수체는 제 2회 중기에서 관찰되는 경우가 많다. Chinese hamster 세포주의 경우 세포주기는 12~17시간이나, 연속처리법에서는 시험물질의 처리에 따라 세포주기가 대폭 지연되는 경우도 있으므로 24 및 48시간째에 표본을 제작한다. 단시간처리법에서는 대사활성화법의 경우와 아닌 경우 모두 일정시간(통상 6시간) 처리 후, 시험물질 처리 개시 후 1.5세포주기에 1회 표본을 제작한다.

단시간처리법, 연속처리법 모두 세포회수 1~2 시간 전에 colcemid를 첨가하여 중기분열상을 모은 후에 염색체 표본을 제작한다. 원칙적으로 각 농도 당 2매의 플레이트를 이용하여 플레이트 당 100개의 중기분열상을 현미경하에서 관찰한다. 표본은 맹검법(Code화, Blind화)으로 관찰한다.

잘 퍼진 중기분열상을 대상으로 염색분체형 또는 염색체형의 구조이상 유무를 기록한다. 이상의 종류, 분류는 대략 아래의 분류로 나누고 이 중 한 종류 이상의 이상을 가진 세포를 이상세포(aberrant cell) 1개로 계측한다. 배수체의 출현율은 별도로 기록한다.

Table. 6.7. 염색체이상의 분류

구조 이상
Gap (g) : 염색분체형, 염색체형을 포함
염색분체형 절단 : (ctb)
염색분체형 교환 : (cte)
염색체형 절단 : (csb)
염색체형 교환 : (cse)
기타 이상 : (단편화 등)
수적 이상
이수성 : (aneuploid)
배수성 : (polyploid) (핵내배화 endoreduplication도 포함)

염색체 수 이상에는 배수성(polyploid)과 이수성(aneuploid)이 있다. 인체 림프구처럼 정이배체 세포를 대상으로 하는 경우에는 동원체 수의 변화에 따라 이수성을 구별할 수 있으나, 계대 배양

되어 온 세포주에서는 염색체수의 변화를 기록하는 것이 곤란하므로 배수성만을 기록하는 것으로 한다. 표시할 때는 이상세포수의 합계는 gap만을 가진 세포를 제외한 경우(-g)와 포함한 경우(+g)로 나누어 표시한다.

염색체 이상의 판정은 시험자에 따라 반드시 일치하지 않으나 무처리 또는 용매대조군에서의 출현율과 비교해서 시험군에서 유의한 증가가 보이고 명확한 용량의존성이 인정된 경우에는 양성으로 판정한다.

#### 가. 시험방법 및 결과

포유동물 세포인 Chinese hamster lung fibroblast(CHL)을 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 37°C 온도로 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)과 10 µg/ml의 penicillin과 10 µg/ml의 streptomycin이 포함된 Eagle's minimum essential medium(EMEM, GIBCO)에 단층 배양하여 사용하였다.

*Aralia elata*에서 추출한 시험물질은 멸균증류수에 희석하였고 시험물질의 농도를 결정하기 위하여 예비독성시험을 실시하였다. 1x10<sup>5</sup> 세포를 사용하였고, 6시간동안 추출물을 농도별(공비 2로 3단계의 농도)로 처리하고 0.4% trypan blue로 염색하여 염색 세포 수를 세어서 세포증식을 50% 억제하는 농도를 산출하고 본 시험의 최고 농도로 하였다. 양성대조물질인 mitomycin C와 cyclophosphamide는 멸균증류수에 용해하여 각각 0.1 과 10 µg/ml의 농도로 사용하였다. 음성대조물질은 멸균증류수를 사용하였다. 모든 시험은 2회 반복하여 수행하였다.

시험물질의 염색체 이상 여부를 판단하기 위하여 OECD(1993)와 Ishidate & Odashima(1977)의 방법을 조금 변형한(Ryu et al., 1993, 1994, 1996a,b) 다음과 같은 방법을 사용하였다.

예비독성시험에서 결정된 50% 세포독성 농도를 최고 농도로 하고, 공비 2로 3단계의 농도를 시험농도로 하였다. 대사활성 존재하의 시험은 CHL 세포를 petridish에서 3일간 배양한 후 시험물질 및 양성대조물질(mitomycin C 0.05 µg/ml) 함유 배양액에 S-9 혼합액(배양액의 20%비율)을 첨가하여 6시간 배양하고 보통 배양액으로 교환하여 18시간 이상 더 배양하였다. 세포 수거 2시간 전에 colcemid(Gibco)를 처리한 후, trypsin을 사용하여 세포를 분리하고 원심분리하였다. 세포를 KCl 저장액(37°C)에서 20분간 방치한 후, 고정액(methanol : glacial acetic acid = 3 : 1)으로 3번 반복하여 고정시킨 후 Slide를 제작하였다. Slide를 완전하게 말린 후 5% Giemsa(Gibco) 용액으로 염색하고 현미경으로 관찰하였다. 200개의 metaphase 세포에서 염색체이상을 관찰하였고 염색체 이상의 분류는 JEMS-MMS(1988)을 따랐다. 특별히 본 시험에서는, gap을 chromatid의 폭보다 좁은 결손으로 분류하였다. 수적 이상은 4배수체 이상만 기록하였고, 구조이상의 종류를 1개 이상 갖는 세포를 양성세포 1개로 계수하고 종류를 각각 기록하여 염색체이상을 보이는 세포의 퍼센트 값을 구하고, Fishers exact test(Altman, 1993)를 사용하여 통계적인 유의차를 분석하였다. 따라서 용량 의존적인 증가와 유의차 분석에 의한 p-value값에 따라 양성 여부를 판정하였다.

대사활성 부재하의 시험은 CHL 세포를 petri dish에서 3일간 배양 후 시험물질 및 양성대조물질(mitomycin C, 0.05 µg/ml) 함유배양액을 첨가하여 6시간 배양하고 보통 배양액으로 교환하여 18시간 이상 더 배양하였다. 또는, 시험물질 및 양성대조물질 함유배양액으로 24시간을 배양하였고 세포 수거 2시간 전에 colcemid를 처리한 후 위의 방법에 따라 세포를 처리하여 염색체이상을 관찰하였다.

Fig. 6.11.부터 Fig. 6.14.는 CHL 세포에 대해 처리 되는 최고농도를 지정하기 위한 예비독성시험 결과이다.

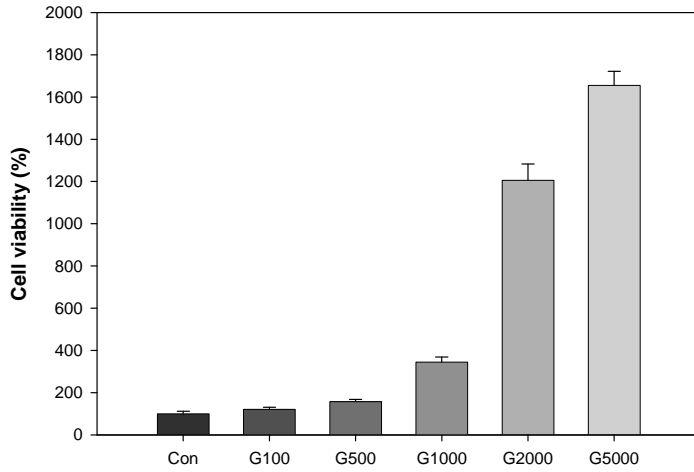


Fig. 6.11. MTT assay of CHL cell depending on green tea(G) concentration without S9 mixture.

Con : control, G100 : green tea 100  $\mu\text{g/ml}$ , G500 : G 500  $\mu\text{g/ml}$ , G1000 : G 1 mg/ml, G2000 : G 2 mg/ml, G5000 : G 5 mg/ml

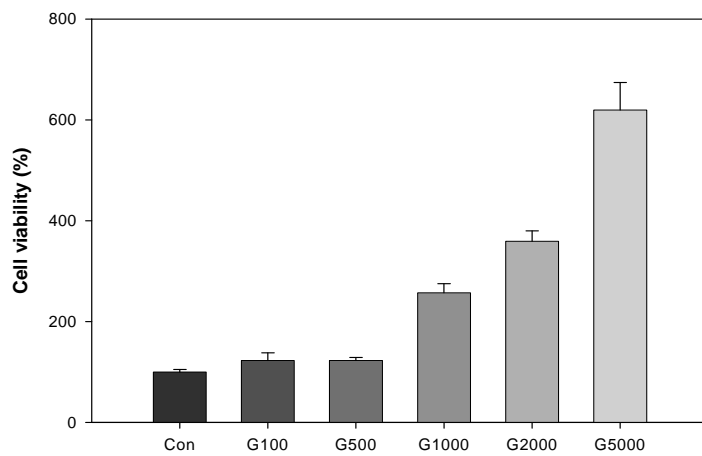


Fig. 6.12. MTT assay of CHL cell depending on green tea(G) concentration with S9 mixture.

Con : control, G100 : green tea 100  $\mu\text{g/ml}$ , G500 : G 500  $\mu\text{g/ml}$ , G1000 : G 1 mg/ml, G2000 : G 2 mg/ml, G5000 : G 5 mg/ml

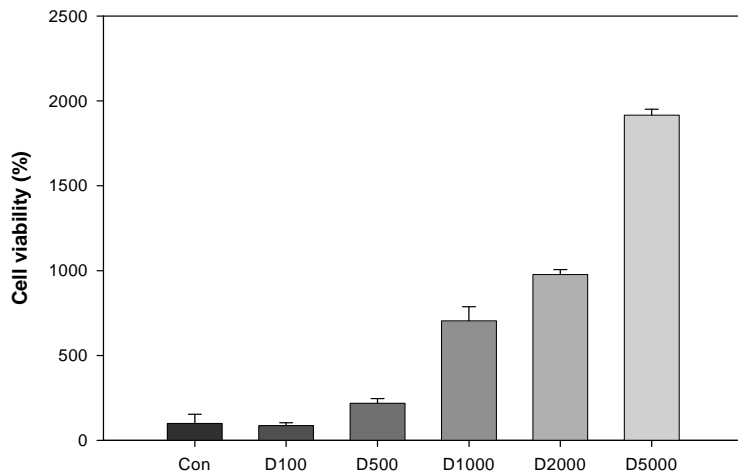


Fig. 6.13. MTT assay of CHL cell depending on decaffeinated green tea(D, C10) concentration without S9 mixture.

Con : control, D100 : decaffeinated green tea 100  $\mu\text{g/ml}$ , D500 : D 500  $\mu\text{g/ml}$ , D1000 : D 1 mg/ml, D2000 : D 2 mg/ml, D5000 : D 5 mg/ml

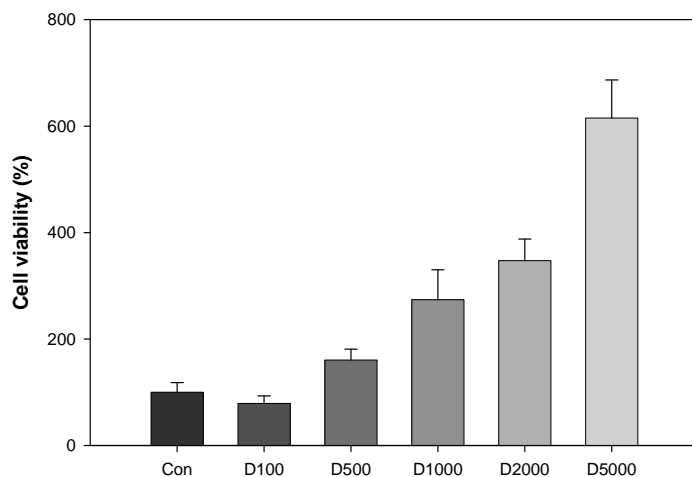


Fig. 6.14. MTT assay of CHL cell depending on decaffeinated green tea(D, C10) concentration with S9 mixture.

Con : control, D100 : decaffeinated green tea 100  $\mu\text{g/ml}$ , D500 : D 500  $\mu\text{g/ml}$ , D1000 : D 1 mg/ml, D2000 : D 2 mg/ml, D5000 : D 5 mg/ml

포유동물 세포주인 CHL 또는 CHO 세포를 이용한 염색체이상시험은 그 재현성 및 간편성으로 인하여 in vitro에서의 유전자에 대한 영향을 검색하는 시험법으로 현재 가장 널리 사용되고 있다. 본 시험의 시험물질에 대한 염색체이상시험 결과는 다음과 같다.

염색체이상 빈도는 Table 6.8에 gap을 포함하지 않은 경우와 gap을 포함하는 경우를 각각 기록하였고 다음의 결과 기술 및 염색체이상 유무의 판정은 시험방법에서 제시한 바와 같이 gap을 포함하지 않는 경우를 기준으로 하였다.

Table 6.8 Summary of results obtained from chromosome aberration test of Decaffeine green tea

**TEST 1**

	Exposure period (hours)	Test substance concentration( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		No. of counted cells	Cells with Chromosome aberration		
					Aberration cells excluding gaps (%)	Aberration cells including gaps (%)	No. of normal cells
S9 mix (+)	6	NC		200	0.5	1.0	198
		( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	5000	200	1.0	2.0	196
			2000	200	0.5	1.0	198
			1000	200	0.5	1.5	197
		CP		200	51.0*	52.5	95
S9 mix (-)	6	NC		200	0.0	0.5	199
		( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	5000	200	1.0	1.0	198
			2000	200	0.5	1.0	198
			1000	200	0.5	1.0	198
		MMC		200	43.0*	44.5	111

\* :  $P < 0.001$ ,

otherwise :  $P > 0.05$  comparison with negative control by Fisher's exact test,

NC : EMEM media, CP : Cyclophosphamide, MMC : Mitomycin C

**TEST 2**

	Exposure period (hours)	Test substance concentration( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		No. of counted cells	Cells with Chromosome aberration		
					Aberration cells excluding gaps (%)	Aberration cells including gaps (%)	No. of normal cells
S9 mix (-)	24	NC		200	0.5	1.0	198
		( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	5000	200	1.0	1.5	197
			2000	200	0.5	1.0	198
			1000	200	0.5	1.0	198
		MMC		200	50.0*	52.5	95

\* :  $P < 0.001$ ,

otherwise :  $P > 0.05$  comparison with negative control by Fisher's exact test,

NC : EMEM media, CP : Cyclophosphamide, MMC : Mitomycin C

**1) Test 1**

S9 혼합물과 함께 시험물질을 5000, 2000, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 6시간 동안 처리한 경우, 200개 중



기상세포 중 염색체의 구조적 이상 빈도는 1.0, 0.5, 0.5 %로 통계적으로 유의한 (P>0.05) 증가를 나타내지 않았다.

S9 혼합물과 함께 처리한 양성대조물질(CP)은 51.0%, S9 혼합물을 첨가하지 않은 양성대조물질 (MMC)도 43.0 %로서 현저한 염색체이상을 유발하였다(각각 P<0.001) (Table 6.8).

실험 조건에 따른 염색체이상의 종류는 Table 6.9에 기록하였다.

Table 6.9. Metaphase analysis data - Test 1

S9 mix	Time (hour)	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	ctb	cte	csb	cse	Aberration excluding gap (%)	ctg	csg	endo	Aberration including gap (%)	Normal cells (No.)
+	6	NC	1	0	0	0	0.5	1	0	0	1.0	198
		5000	2	0	0	0	1.0	2	0	0	2.0	196
		2000	1	0	0	0	0.5	1	0	0	1.0	198
		1000	1	0	0	0	0.5	2	0	0	1.5	197
		CP	53	45	1	3	51.0	3	0	0	52.5	95
-	6	NC	0	0	0	0	0.0	1	0	0	0.5	199
		5000	1	1	0	0	1.0	0	0	0	1.0	198
		2000	1	0	0	0	0.5	1	0	0	1.0	198
		1000	1	0	0	0	0.5	1	0	0	1.0	198
		MMC	39	41	2	4	43.0	3	0	0	44.5	111

ctb : chromatid break

cte : chromatid exchange

csb : chromosome break

cse : chromosome exchange

ctg : chromatid gap

csg : chromosome gap

endo : endoreduplication

CP : Cyclophosphamide

MMC : Mitomycin C

NC : EMEM media

Time : exposure period

## 2) Test 2

S9 혼합물을 첨가하지 않고 시험물질을 24시간 동안 연속 처리한 경우도 5000, 2000,1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 염색체의 구조적 이상빈도가 1.0, 0.5, 0.5 %로 통계적으로 유의한 증가를 보이지 않았고 (P>0.05), 양성대조물질 MMC를 처리한 군은 50.0 %로서 현저한 염색체이상이 관찰되었다

(P<0.001)(Table 6.8).

실험 조건에 따른 염색체이상의 종류는 Table 6.10에 기록하였다.

위의 결과에서 양성대조물질인 cyclophosphamide와 mitomycin C는 각각의 조건에서 현저한 염색체이상을 유발하여 S9 혼합물의 유효성과 본 시험 시스템의 민감성이 입증되었고, 음성대조군인 용매처리 군에서도 염색체이상세포수가 시험적합성판정 범위 내로 평가되어 본 시험의 타당성이 입증되었다.

Table 6.10. Metaphase analysis data - Test 2

S9 mix	Time (hour)	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	ctb	cte	csb	cse	Aberration excluding gap (%)	ctg	csg	endo	Aberration including gap (%)	Normal cells (No.)
-	24	NC	1	0	0	0	0.5	1	0	0	1.0	198
		5000	2	0	0	0	1.0	1	0	0	1.5	197
		2000	1	0	0	0	0.5	1	0	0	1.0	198
		1000	1	0	0	0	0.5	1	0	0	1.0	198
		MMC	52	41	4	3	50.0	3	2	0	52.5	95

ctb : chromatid break

cte : chromatid exchange

csb : chromosome break

cse : chromosome exchange

ctg : chromatid gap

csg : chromosome gap

endo : endoreduplication

MMC : Mitomycin C

NC : EMEM media

Time : exposure period

따라서, 시험물질 Decaffeine green tea는 본 시험 조건 하에서 CHL세포에 대한 염색체이상을 일으키지 않는 물질로 평가된다.

## 제 7 절 생산소재의 *in vivo* 기능성 효능 연구

### 1. *In vivo* 간독성에 대한 방어기능활성 연구

가. tert-Butyl Hydroperoxide에 의해 유도된 랫드의 간 독성에 대한 녹차의 보호효과

본 실험은 tert-Butyl Hydroperoxide (t-BHP)에 의해 유도된 랫드의 간독성에 대한 녹차의 보호효과를 살펴보기 위해 진행하였다. 즉, 산화스트레스를 유발하는 t-BHP의 간보호 효과를 조사하기 위해 1일 1회 5일간 일정시간에 경구 투여법으로 녹차 및 탈카페인 녹차 추출물 1000 mg/kg을 투여한 후, 마지막 날 0.2 mmol/kg t-BHP를 복강 주사하여 급성 간 독성을 유발하였다. 대조군은 t-BHP 대신 생리식염수를 복강 주사하였다. 복강 주사한지 18시간 후, 에테르로 마취시켜 혈액 생화학적 분석을 위하여 복대 정맥으로부터 채혈하였고 간은 생리식염수로 닦은 후 조직학적 분석을 위해 10% 포르말린 용액에 고정시켰다. 나머지 간 조직은 생화학적 분석을 위해서 액체 질소로 급속 냉동 후 -70°C에 저장하였다.

#### 1) 혈청 생화학적 수치 측정

혈액 샘플을 진공 채혈관에 수거한 후 원심분리하여 혈청만을 모아 효소 활성을 측정함. 혈청 중 GPT (glutamic pyruvic transaminase) 와 GOT (glutamic oxaloacetic transaminase)는 간세포 내에 있는 효소로 간 독성으로 인한 간세포의 괴사와 간 조직의 파괴가 진행함에 따라 aminotransferase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내는 것으로 간 손상의 지표로 사용되었다. 효소 활성도 측정은 Reitman 및 Frankel의 방법에 따라 영동제약 kit를 사용하여 혈청에서 측정하였다. GOT 또는 GPT 기질을 1 ml 시험관에 넣고 37°C 수조에서 각각 60분 및 30분간 반응시킨 후 0.4 N NaOH을 10 ml 넣어 반응을 종결시킴. 결과 값은 반응 중지 30분 후 흡광도 505nm에서 표준액, 검체 및 대조군의 흡광도를 측정하고 여기서 얻은 검량 곡선을 이용하여 효소의 활성단위로 환산하였다.

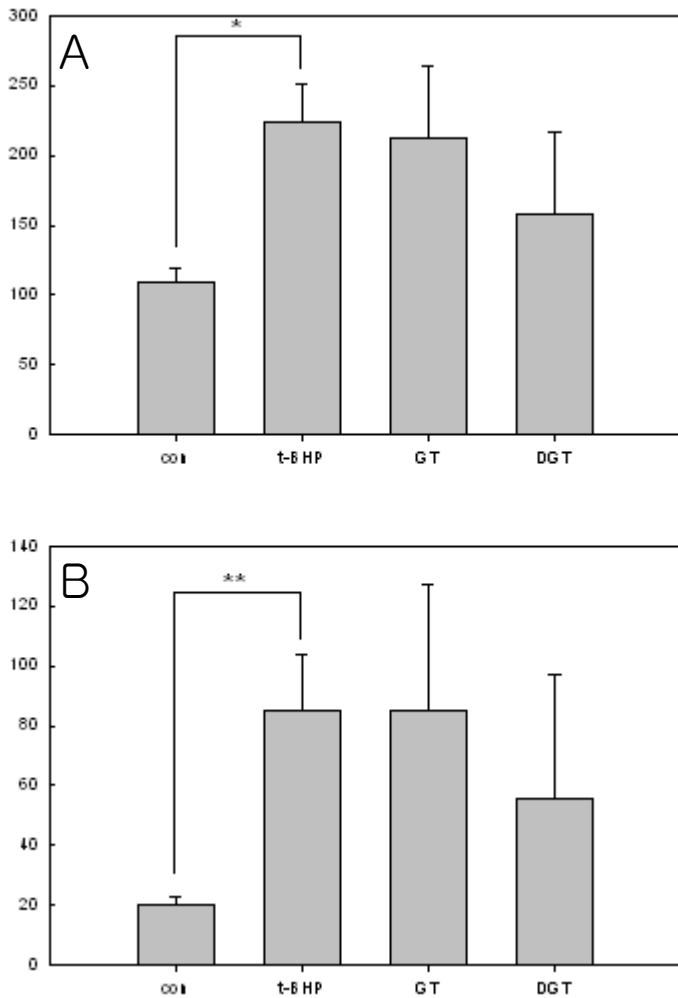


Fig. 7.1. 혈청학적 효소 (GOT/GPT) 분석.

A: GOT (IU/L) B : GPT (IU/L)

con : control group, t-BHP : t-BHP group, GT : t-BHP + 녹차 1000 mg/kg 투여 group, DGT : t-BHP + 탈카페인된 녹차 1000 mg/kg 투여 group

\* P<0.1 \*\*P<0.01

혈청 중 GPT와 GOT는 간세포 내에 있는 효소로 ALT (alanin aminotransferase)와 AST (aspartate aminotransferase)라고도 한다. 이 효소들은 거의 모든 장기에 존재하며, 이 중 AST는 심장, 간, 골격, 혈구 내에 주로 존재하고, 80%가 세포 내의 미토콘드리아에 존재한다. 이에 비해 ALT는 주로 간에 분포하고 세포질에 존재한다. Fig. 7.1에서 보는 바와 같이 GPT 및 GOT는 t-BHP 투여 이후 혈청생화학 수치가 대조군에 비해 각각 223.37 (IU/L)와 85 (IU/L)로 약 4.1배 및 2배의 증가를 나타낸다. 녹차 투여군은 GPT 및 GOT의 활성이 각각 85 (IU/L) 와 211.89 (IU/L)로 t-BHP 투여로 효소의 활성을 감소시키는 효과가 없거나 미미한 반면, 탈카페인 녹차 투여군의 경우 GPT 및 GOT의 활성이 각각 55.83 (IU/L)와 157.81 (IU/L)으로 감소하여 t-BHP에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 일반 녹차보다 높음을 암시해준다.

## 2) 간 조직병리학적 병소 억제 평가

Hematoxylin & Eosin stain을 일반 염색이라 부르며, 가장 기본적인 조직 진단법으로서 사용되었다. 병리학적 영향을 측정하기 위하여 채취된 간을 10% 포르말린을 이용하여 고정 후, 24시간 동안 탈수 과정을 거쳐 조직을 투명화하여 paraffin을 침투시켜 포매함. 완성된 블록은 5  $\mu$ M로 절편을 만들어 슬라이드에 도말, 건조한 후, xylene으로 paraffin을 제거함. Hematoxylin은 약염기성이므로 핵산에 결합하여 핵을 자주색으로 염색, Eosin은 약산성이므로 염기성을 가진 단백질에 결합하여 세포질을 분홍색으로 대조 염색함. 질병에 의해 일어난 조직의 변화는 광학 현미경으로 검사하였다.

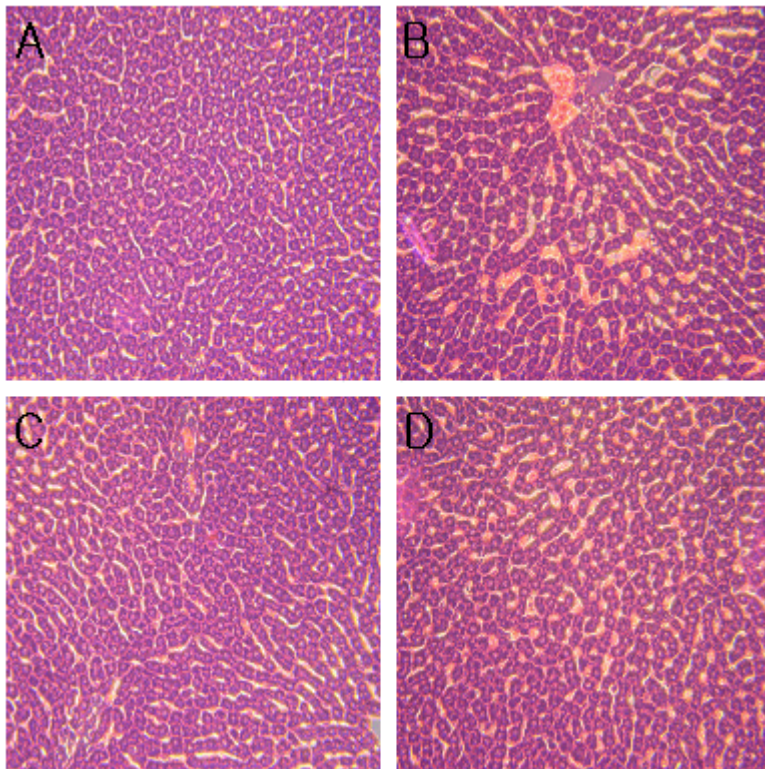


Fig. 7.2. t-BHP에 의해 유도된 간독성에 대한 녹차 및 탈카페인 녹차의 효과.

각각 그룹의 간 조직을 hematoxylin/eosin 염색법을 통해 현미경으로 관찰함. (magnification $\times$ 200)  
A : control group, B : t-BHP group, C : t-BHP + 녹차 1000 mg/kg 투여 group, D : t-BHP + 탈카페인된 녹차 1000 mg/kg 투여 group

간의 조직학적 검경은 생체의 형태 및 기능의 변화를 확인하여 질병의 원인, 발병 기전, 형태적 변화 및 기능적 장애를 관찰하여 질병의 진단과 예후 판정을 하는 것이다. Fig. 7.2.에서 보는 바와 같이 대조군(A)은 정상세포로서 핵이 뚜렷이 보이며 그 간격이 일정하고, 잘 짜여진 소엽구조를 관찰할 수 있는 반면, t-BHP 단독 투여군(B)은 세포의 파괴로 인해 중심 소엽주위의 염증 세포와 가역적인 수포 변성을 나타내었다. 녹차 투여군(C)과 탈카페인 녹차 투여군(D)은 일부 간세포가 파괴되고 세포간극이 넓어져 있으나, t-BHP에 의한 간 손상을 미미하게 회복되었음을 확인

할 수 있다.

### 3) 간조직의 GSH/GSSG 변화 평가

세포 내에 독성 또는 산화적 손상이 일어난 경우 GSH는 감소하게 되어 GSH/GSSG의 불균형을 초래하게 되어 방어기전으로서의 역할이 소실됨. 즉, GSH는 radical에 의한 세포 손상을 방지하고 세포 내 해독 작용을 담당하는 중요한 물질로 여겨짐. GSH/GSSG함량을 측정하기 위해 1.15 M KCl에 균질화 한 간 조직을 20 mM HEPE buffer (50 mM NEM, pH 7.4)에 녹인 후 최종 농도 5%가 되도록 perchloric acid를 넣음. 단백질이 침전되면 원심분리(400 rpm, 10 min)하여 상등액을 취하고 여기에 iodoacetic acid를 첨가한 후 과포화가 되도록 KHCO<sub>3</sub>를 넣어 CO<sub>2</sub>를 제거 해줌. 암실에서 상온 상태로 20분간 보관 후 상등액을 분리하고 동량의 3% FDNB를 첨가하여 4°C에서 24 시간 보관한 다음, 상등액을 여과하여 HPLC 분석에 사용함. GSH (glutathione)을 내부 표준물질로 사용함.

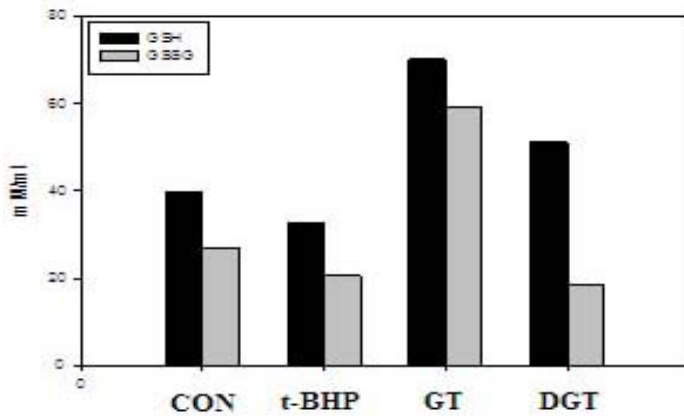


Fig. 7.3 Effect of GT, DGT on the hepatic glutathione (GSH) content induced by *t*-BHP in rats. Values are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3)

con : control group, *t*-BHP : *t*-BHP group, GT : *t*-BHP + 녹차 1000 mg/kg 투여 group, DGT : *t*-BHP + 탈카페인된 녹차 1000 mg/kg

Rat liver의 GSH 함량은 0.2 mmol/kg *t*-BHP만 투여한 실험군이 대조군에 비해 유의적으로 감소되었으며, DGT, DT 추출물 처리 후 0.2 mmol/kg *t*-BHP을 투여한 실험군에서 GSH 함량이 증가한 경향을 나타내었다. 이것은 *t*-BHP와 같은 독성물질이 투여되었을 경우에 GSH가 독성물질을 대사시켜 체외로 배출되는데 이용되므로 GSH 함량이 감소되며 반면에 GSSG 함량은 증가하고, DGT, DT 추출물 처리 한 다음 *t*-BHP 투여시 GSH 함량이 증가되고 GSSG함량은 감소되는 것은 DGT, DT 추출물이 oxidative stress를 유발시키는 *t*-BHP의 세포막 수포현상과 지질과산화 형성을 저해함으로써 최종적으로 무독화 과정에 관여한 것으로 생각된다.

### 4) 간조직의 EROD/MROD 측정

CYP1A1은 EROD(7-ethoxyresorufin O-diethylase)라는 효소를 생성하고, CYP1A2는 MROD(methoxyresorufin O-dimethylase)를 각각 생성함에 따라, 각각의 효소 측정은 간에서의 특정 독성물질의 해독이 얼마나 진전되고 있는지를 알려주는 지표라 할 수 있다. CYP 1A1과 CYP 1A2는 생체 이물질의 산화와 환원 및 수화작용을 일으키는 효소로써, 이를 통해 이물질의 작용기를 conjugation 결합이 일어나기 쉽게 만들어준다. Conjugation 결합은 이물질이 신장이나 담즙산이 이물질 제거를 용이하게 한다. 전체적인 해독 과정을 보면 CYP 1A1과 CYP 1A2는 필수불가결한 효소이지만 부분적인 역할을 보면 항상 긍정적인 부분만 있는 것은 아니다. 그 원인은 CYP 1A1과 CYP 1A2는 발암 원인 물질을 활성화시켜 암을 일으킬 수도 있기 때문이다. 여러 논문에서 산화를 일으키는 물질과 CYP 1A1, CYP 1A2 활성의 관계에 대해, 간 독성을 일으키거나 산화 작용을 하는 많은 화합물이 CYP 1A1과 CYP 1A2의 활성을 증가시킨다는 결과가 나와 있다. 예를 들어, 산화 작용을 하는 대표적인 물질인 tert-butyl hydroperoxide의 존재하에서 CYP 1A2, CYP 1A2의 활성이 활발해진다. 이 실험에서 각각 그룹의 간 조직을 가지고 녹차와 탈카페인 녹차 투여군이 CYP 1A1과 CYP 1A2 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

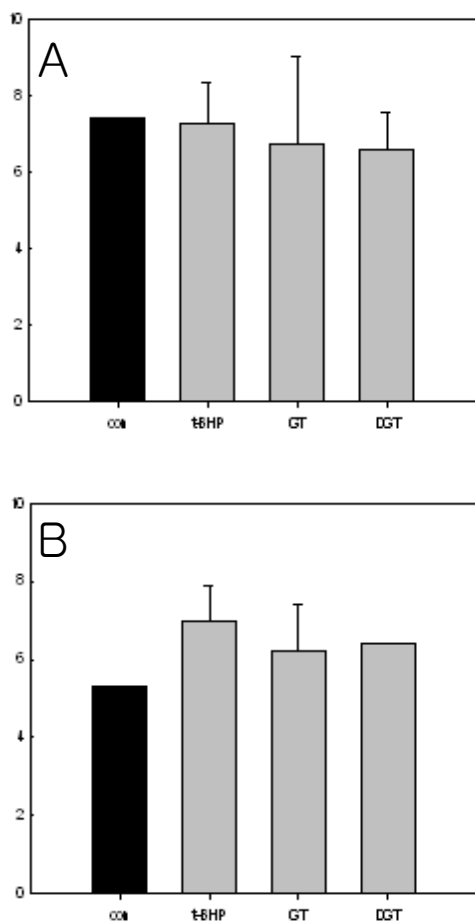


Fig. 7.4 Enzyme activity (EROD/MROD) in rat liver.

A : EROD activity (pmol/min/mg) B: MROD activity (pmol/min/mg)

con : control group, t-BHP : t-BHP group, GT : t-BHP + 녹차 1000 mg/kg 투여 group, DGT

: t-BHP + 탈카페인된 녹차 1000 mg/kg 투여 group (n=3)

간 조직 내의 CYP450효소, 즉 CYP1A1 및 CYP1A2의 활성은 Fig. 7.4.에서 보는 바와 같이 EROD(A)의 효소 활성의 경우, 대조군과 t-BHP 단일 투여군이 각각 7.4 pmole/min/mg와 7.3 pmole/min/mg으로 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 이에 반해 녹차 투여군 및 탈카페인 녹차 투여군은 각각 6.7 pmole/min/mg와 6.6 pmole/min/mg으로 일부 효소의 활성을 낮춰주는 효과를 보였으나 이 두 그룹 간의 유의적 차이는 없는 것으로 확인되었다. MROD(B) 효소활성의 경우, 대조군과 t-BHP 단일 투여군이 각각 5.29 pmol/min/mg와 6.99 pmole/min/mg으로 CYP1A2 효소 활성이 t-BHP에 의해 약 1.3배 증가한 것으로 관찰되었다. 녹차 투여군 및 탈카페인 녹차 투여군의 경우 각각 6.21 pmole/min/mg와 6.39 pmole/min/mg으로 각각 t-BHP에 의해 증가한 CYP1A2 효소 활성을 11%와 8.6% 낮춰주어 산화 스트레스에 대한 보호 효과가 있는 것으로 판정되었다.

## 2. *In vivo* 항암성 효능 연구

국내에서 널리 응용되고 있는 녹차에 대해서 녹차 추출물을 이용하여 암세포주에 투여하여 투여량에 따라 수치학적인 변화와 세포손상의 정도를 비교, 분석하여 녹차 추출물의 항암효과를 규명하는 것이 본 연구의 목적이다.

가. 간암모델(Solt-Farber protocol)을 이용한 항암활성 평가

### 1) 간암세포인 HepG2에 미치는 녹차추출물의 세포생존율 측정

녹차 추출물이 항암 효과를 가지고 있다면 간암 세포인 HepG2에 대하여 세포사멸을 일으키는 효과 있음을 근거로 하여 MTT assay를 통한 세포 생존율을 측정하였다.

MTT assay는 노란색의 가용성 tetrazolium염이 살아있는 세포의 미토콘드리아에 의해 파란색의 불용성 formazan 생성물로 환원되는 원리를 이용한 실험이다. 따라서 살아있고 대사적으로도 왕성한 세포의 농도를 흡광도 값으로 반영하여 세포 생존율을 측정할 수 있다.

20시간 후에 배양 용기 표면에 부착된 HepG2에 녹차 추출물을 100, 500, 1000, 2000, 3000  $\mu$ g/ml의 농도로 37°C incubator에서 2 시간 처리 후 Morten 등에 의한 방법을 일부 변형하여 MTT assay를 하였다. 즉, L-15 HEPES medium에 5mg/mL MTT용액을 40  $\mu$ l 넣고 37°C에서 3 시간 처리 후 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시킨 것에 1 N HCl에 녹아있는 10% SDS 200  $\mu$ l를 넣고 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 처리군의 MTT값은 대조구를 100%로 기준하여 viability 감소로 표시하여 세포 손상정도를 파악하였다.



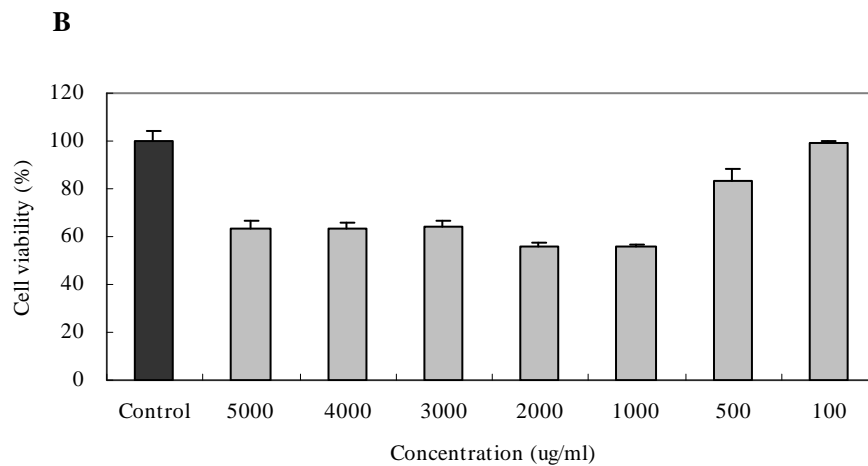
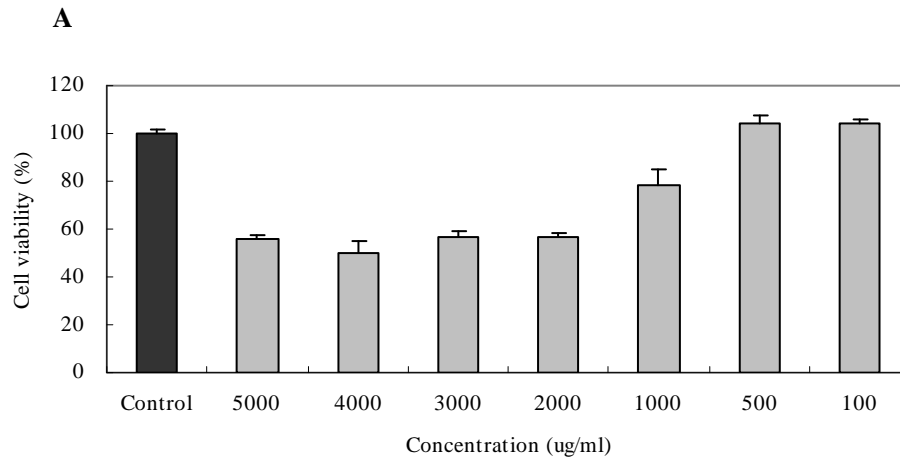


Fig. 7.5. The effects of DGT and GT extracts on cell viability of HepG2 cells.

They were measured by MTT activities in control and experimental group after treatment with DGT and GT extracts 100, 500, 1000, 2000, 3000 µg/ml for 2 hours. Each MTT activity was quantitated as the percentage against the control. Results are expressed as mean ± S.D. (n=3)

A : DGT extract, B: GT extract

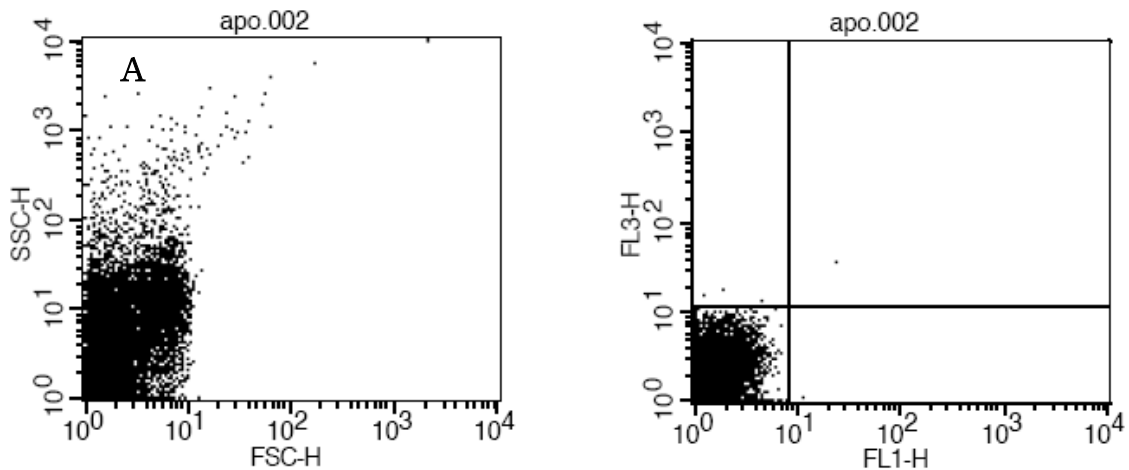
세포생존률 분석결과 DGT, GT 모두 고농도로 갈수록 세포생존율이 감소하는 것을 관찰할 수 있다. DGT의 경우는 1000 µg/ml의 농도에서  $78.48 \pm 6.34$  %의 세포생존율을 나타냈으나, 2000 µg/ml의 농도에는  $56.87 \pm 1.55$  % 세포생존율을, 그 이상의 농도에서는 2000 µg/ml의 농도와 비슷한 세포 생존율을 나타내었다. 반면 GT의 경우는 1000 µg/ml의 농도에서  $55.58 \pm 0.92$  %의 세포생존율을 나타냈으며, 3000 µg/ml의 농도에서는  $64.32 \pm 2.64$  %를 보이며 그 이상의 농도에서는 3000 µg/ml의 농도와 비슷한 세포생존율을 나타내었다.

위의 결과를 토대로 DGT와 GT는 간암세포인 HepG2의 생존을 저해하는 것을 확인 하였으며, 특히 고농도로 갈수록 DGT ( 3000 µg/ml의 농도에서  $57.02 \pm 2.51$  %)가 GT ( 3000 µg/ml의 농도에서  $64.33 \pm 2.64$  %)보다 더 높은 간암세포인 HepG2의 생존을 저해하는 것을 확인 할 수 있다.

나. 간암세포인 HepG2에 미치는 녹차추출물의 자연사 (apoptosis)와 괴사 (necrosis) 측정 (유세포 분석 : Flow cytometry system)

녹차 추출물의 항암효과와 관련된 현상은 전통적으로 세포의 사멸현상인 괴사, 근래에 부각되고 있는 자연사, 그리고 자연사와 밀접한 관련이 있는 세포주기의 장애, 그 외 암의 증식과 관련된 단백질(효소)의 불활성화 및 파괴 등으로 설명하고 있다. 본 연구에서는 간암세포에 대한 녹차 추출물의 효과를 자연사, 괴사 등의 각각의 관점에서 관찰하였으며, 본 연구에서 녹차의 항암기전에 관여하는 세포사멸에 대한 조사를 유세포 분석방법을 통하여 조사하였다.

20시간 후에 배양 용기 표면에 부착된 HepG2에 녹차 추출물을 1000, 2000 µg/ml의 농도로 37°C incubator에서 2 시간 처리 후, trypsin-EDTA를 처리하여 배양용기 표면에서 세포를 떼어낸 후 원심분리관에 모아 원침하여 세포덩어리를 얻었다. 이렇게 모아진 세포덩어리에 PI와 FITC 염색약으로 30 분간 염색한 후 인산완충용액으로 세척한 후 원침하였다. 준비된 세포는 유세포분석기(Beckton Dickinson, FACS Calibur, Light Source: Argon ion laser 488nm, Red diode laser 635nm, Fluorescence Sensitivity: 200 FITC/Cell, System Resolution: 1024, Cell Size Range: 0.5, Sorting Speed: 300 cell/sec)를 이용하여 적정 속도로 세포를 분석하였다.



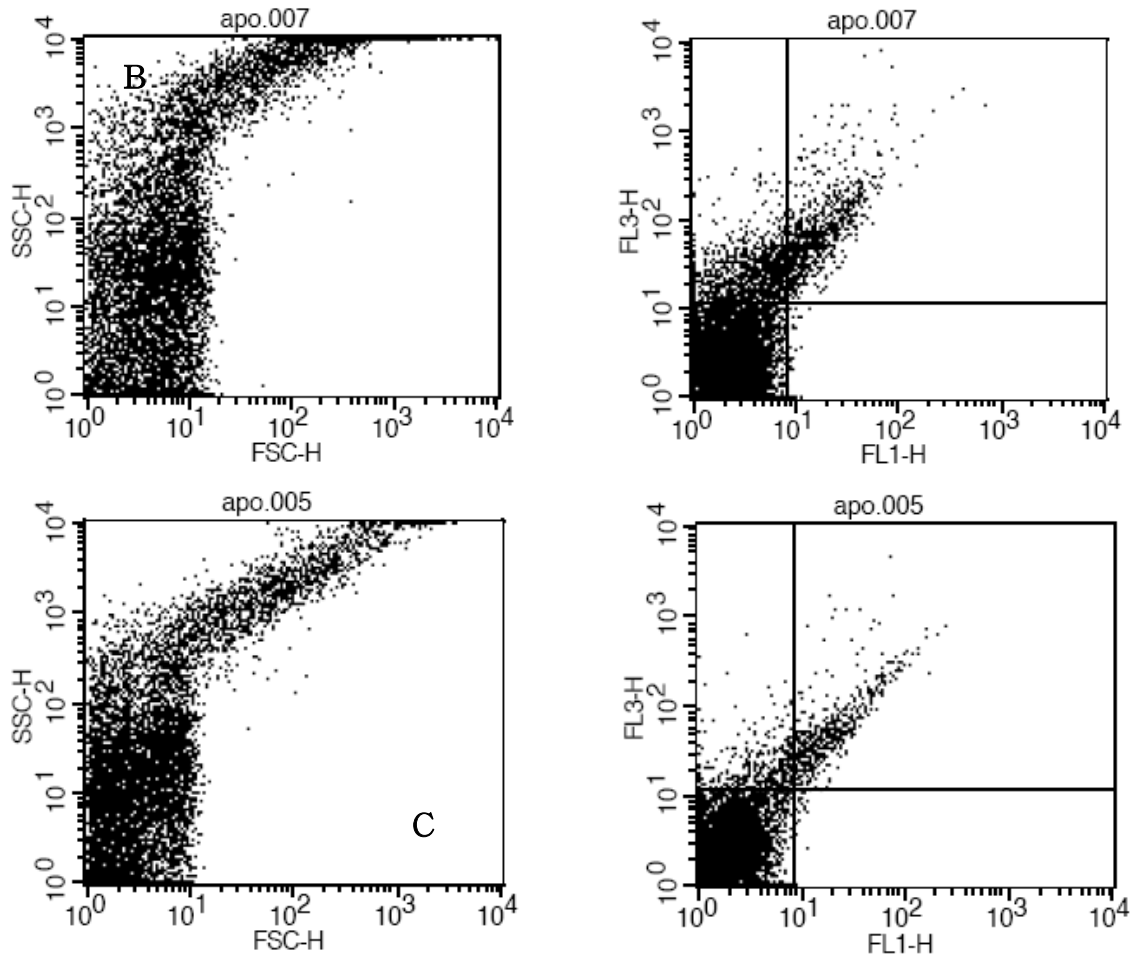


Fig. 7.6. flow cytometric analysis of HepG2 cells (A, B, C) after DGT and GT extracts administration.

(A), (B), (C) are control, DGT 2000, GT 2000  $\mu\text{g/ml}$  extract treatment for 2 hours respectively.

DGT와 GT 추출물 처리에서 사멸의 두 가지 현상인 괴사와 자연사가 모두 관찰되었다. 괴사의 경우 세포의 팽대, 세포소기관의 파괴, 핵의 해체, 다양한 크기의 DNA 절편 출현 등이 연계되어 있고, 자연사의 경우는 자연사소체의 출현, 세포질의 농축, 규칙적인 DNA 절편화, 유세포 분석의 변화 등이 연계되어 있다. HepG2 세포에서 2000  $\mu\text{g/ml}$  녹차 추출물 처리에 의해 괴사와 자연사의 현상이 모두 나타났으며, 농도에 따라 증가하는 경향이 나타났으며 세포 손상이 더욱 광범위하게 일어났다 (테이타는 나타내지 않았음). 이는 녹차의 catechin의 암세포에 대한 세포손상은 괴사 뿐만 아니라 자연사도 관여한다는 보고들이 증가하고 있는 것과, 종양이 있는 마우스를 이용하여 실험한 결과 종양세포의 DNA 합성을 억제하고 자연사를 촉진하여 항암 효과를 나타낸다는 보고를 뒷받침하는 자료가 될 수 있다.

따라서 녹차 추출물에 의한 항암효과는 처리농도에 비례하여 증가하였으며, 본 연구가 녹차 추출물의 항암기전에 대한 중요한 기초적 자료가 될 것으로 사료된다.

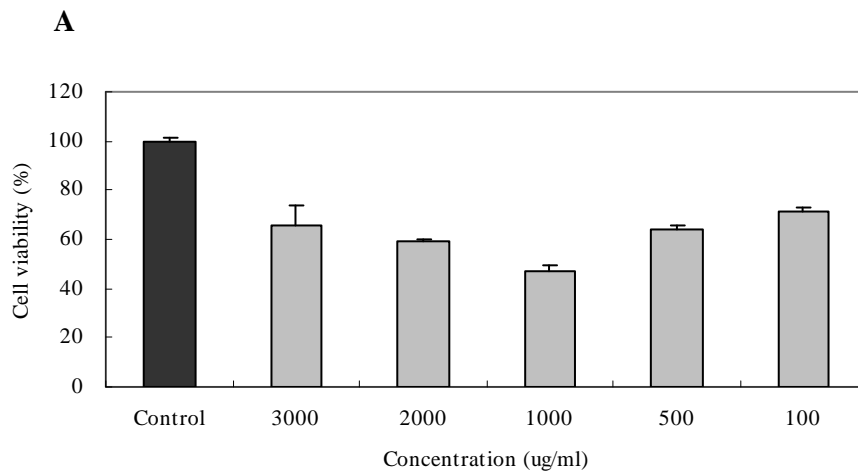
다. 피부암모델(Solt-Farber protocol)을 이용한 항암활성 평가

1) 피부암세포인 B16F1에 미치는 녹차추출물의 cell viability 측정

녹차 추출물이 항암 효과를 가지고 있다면 피부암 세포인 B16F1에 대하여 세포사멸을 일으키는 효과 있음을 근거로 하여 MTT assay를 통한 세포 생존율을 측정하였다.

MTT assay는 노란색의 가용성 tetrazolium염이 살아있는 세포의 미토콘드리아에 의해 파란색의 불용성 formazan 생성물로 환원되는 원리를 이용한 실험이다. 따라서 살아있고 대사적으로도 왕성한 세포의 농도를 흡광도 값으로 반영하여 세포 생존율을 측정할 수 있다.

20시간 후에 배양 용기 표면에 부착된 B16F1에 녹차 추출물을 100, 500, 1000, 2000, 3000 µg/ml의 농도로 37°C incubator에서 2 시간 처리 후 Merten 등에 의한 방법을 일부 변형하여 MTT assay를 하였다. 즉, L-15 HEPES medium에 5mg/mL MTT용액을 40 µl 넣고 37°C에서 3시간 처리 후 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시킨 것에 1 N HCl에 녹아있는 10% SDS 200 µl를 넣고 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 처리군의 MTT 값은 대조구를 100%로 기준하여 viability 감소로 표시하여 세포 손상정도를 파악하였다.



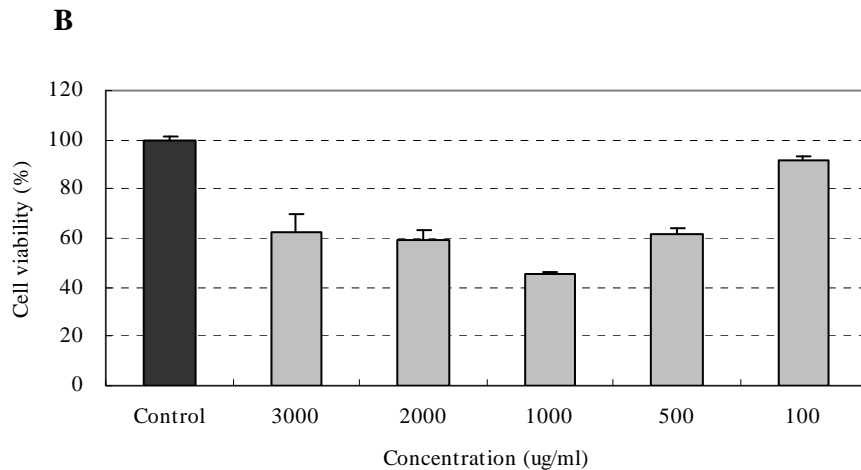


Fig. 7.7. The effects of DGT and GT extracts on cell viability of B16F1 cells. They were measured by MTT activities in control and experimental group after treatment with DGT and GT extracts 100, 500, 1000, 2000, 3000  $\mu\text{g/ml}$  for 2 hours. Each MTT activity was quantitated as the percentage against the control. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=3)  $**P < 0.01$ , compared with cell treated with media alone.

A : DGT extract, B: GT extract

세포생존율 분석결과 DGT, GT 모두 고농도로 갈수록 세포생존율이 감소하는 것을 관찰할 수 있다. DGT의 경우는 1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서  $47.17 \pm 1.95$  %의 세포생존율을 나타냈으나, 2000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에는  $58.96 \pm 1.03$  % 세포생존율을, 그 이상의 농도에서는 2000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도와 비슷한 세포 생존율을 나타내었다. 반면 GT의 경우는 1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서  $45.24 \pm 1.05$  %의 세포생존율을 나타냈으며, 2000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는  $59.33 \pm 3.86$  %를 보이며 그 이상의 농도에서는 2000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도와 비슷한 세포생존율을 나타내었다.

위의 결과를 토대로 DGT와 GT는 피부암세포인 B16F1의 생존을 저해하는 것을 확인 하였으며, 특히 저농도에서는 DGT (100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서  $71.34 \pm 1.38$  %)가 GT (100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서  $91.43 \pm 1.71$  %)보다 더 높은 피부암세포인 B16F1의 생존을 저해하는 것을 확인 할 수 있다.

2) 피부암세포인 B16F1에 미치는 녹차추출물의 자연사 (apoptosis)와 괴사 (necrosis) 측정 (유세포 분석 : Flow cytometry system)

녹차 추출물의 항암효과와 관련된 현상은 전통적으로 세포의 사멸현상인 괴사, 근래에 부각되고 있는 자연사, 그리고 자연사와 밀접한 관련이 있는 세포주기의 장애, 그 외 암의 증식과 관련된 단백질(효소)의 불활성화 및 파괴 등으로 설명하고 있다. 본 연구에서는 피부암세포에 대한 녹차 추출물의 효과를 자연사, 괴사 등의 각각의 관점에서 관찰하였으며, 본 연구에서 녹차의 항암기전에 관여하는 세포사멸에 대한 조사를 유세포 분석방법을 통하여 조사하였다.

20시간 후에 배양 용기 표면에 부착된 HepG2에 녹차 추출물을 1000, 2000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 3

7°C incubator에서 2 시간 처리 후, trypsin-EDTA를 처리하여 배양용기 표면에서 세포를 떼어낸 후 원심분리관에 모아 원침하여 세포덩어리를 얻었다. 이렇게 모아진 세포덩어리에 PI와 FITC 염색약으로 30 분간 염색한 후 인산완충용액으로 세척한 후 원침하였다. 준비된 세포는 유세포분석기(Beckton Dickinson, FACS Calibur, Light Source: Argon ion laser 488nm, Red diode laser 635nm, Fluorescence Sensitivity: 200 FITC/Cell, System Resolution: 1024, Cell Size Range: 0.5, Sorting Speed: 300 cell/sec)를 이용하여 적정 속도로 세포를 분석하였다.

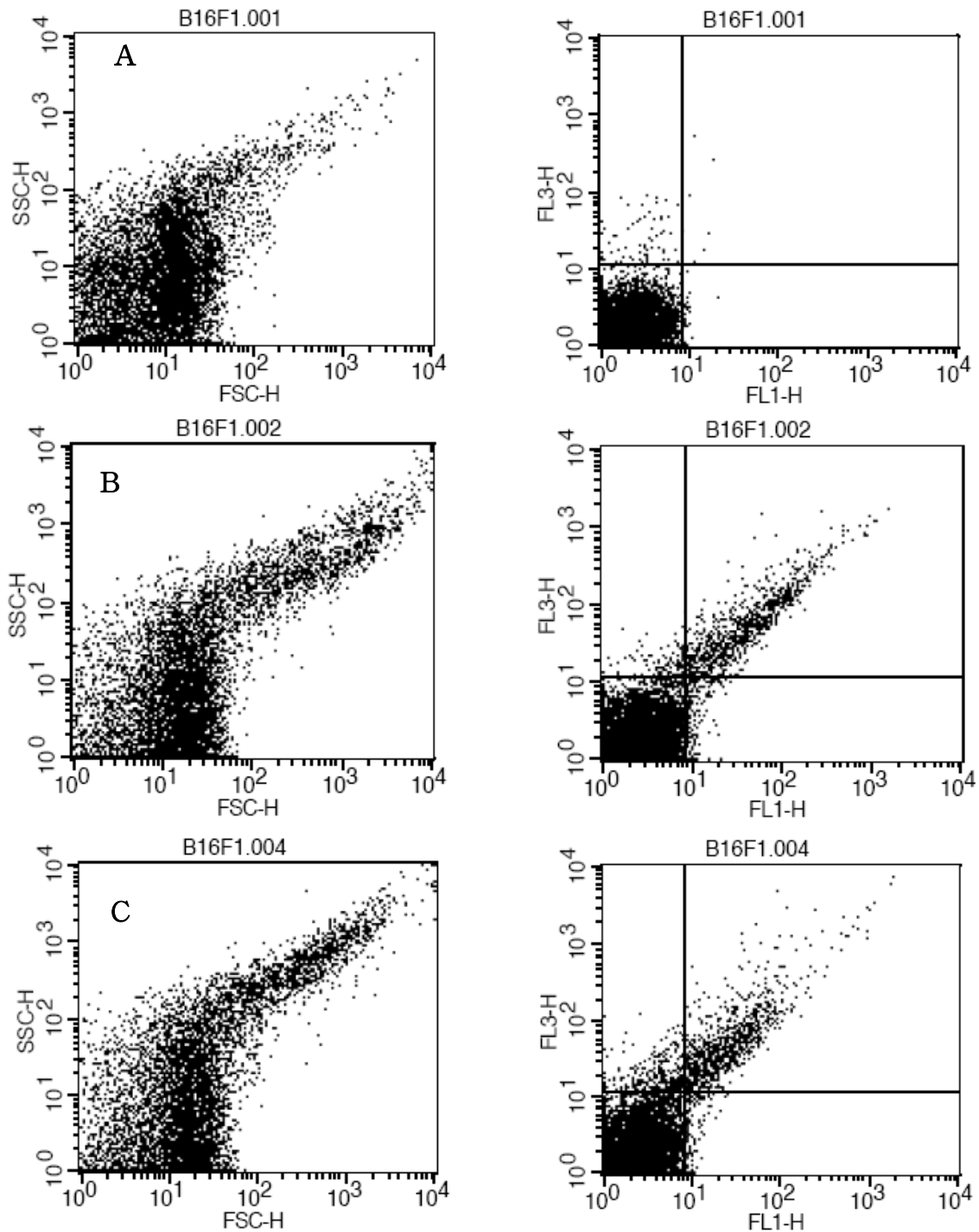


Fig. 7.8. Flow cytometric analysis of B16F1 cells (A, B, C) after DGT and GT extracts

administration.

(A), (B), (C) are control, DGT 2000, GT 2000  $\mu\text{g/ml}$  extract treatment for 2 hours respectively.

DGT와 GT 추출물 처리에서 사멸의 두 가지 현상인 괴사와 자연사가 모두 관찰되었다. 괴사의 경우 세포의 팽대, 세포소기관의 파괴, 핵의 해체, 다양한 크기의 DNA 절편 출현 등이 연계되어 있고, 자연사의 경우는 자연사소체의 출현, 세포질의 농축, 규칙적인 DNA 절편화, 유세포 분석의 변화 등이 연계되어 있다. B16F1 피부암세포에서 2000  $\mu\text{g/ml}$  녹차 추출물 처리에 의해 괴사와 자연사의 현상이 모두 나타났으며, 농도에 따라 증가하는 경향이 나타났으며 세포 손상이 더욱 광범위하게 일어났다 (테이타는 나타내지 않았음). 이는 녹차의 catechin의 암세포에 대한 세포손상은 괴사뿐만 아니라 자연사도 관여한다는 보고들이 증가하고 있는 것과, 종양이 있는 마우스를 이용하여 실험한 결과 종양세포의 DNA 합성을 억제하고 자연사를 촉진하여 항암 효과를 나타낸다는 보고를 뒷받침하는 자료가 될 수 있다.

따라서 녹차 추출물에 의한 항암효과는 처리농도에 비례하여 증가하였으며, 본 연구가 녹차 추출물의 항암기전에 대한 중요한 기초적 자료가 될 것으로 사료된다.

#### 4. In vivo 콜레스테롤 저하능 연구

국내에서 널리 응용되고 있는 녹차에 대해서 녹차 추출물을 이용하여 고콜레스테롤 식이를 통한 비만을 유도한 실험동물에 투여하여 투여량에 따라 혈중 콜레스테롤의 수치학적인 변화와 지질과 산화물의 생산 정도를 비교, 분석하여 녹차 추출물의 콜레스테롤 저하효과를 규명하는 것이 본 연구의 목적이다.

가. Total/LDL/HDL 콜레스테롤억제활성 평가

##### 1) 고콜레스테롤 유도를 위한 고지방 식이조성과 녹차 추출물의 함량

고콜레스테롤을 유도하기 위하여 고지방 식이를 Table 7.1 같이 제조하였다. 일반식이의 지방함량 비율은 전체 칼로리의 20 % 내외이나 본 연구에서의 지방함량은 고지방 식이를 위해 36.7 % 가 되게 만들었다. 녹차 추출물의 함량은 각 식이에 사람이 하루에 평균 섭취하는 300 mg catechin/70 kg/day을 기준으로 실험동물인 햄스터의 기준에 맞춰 430  $\mu\text{g}/100\text{g/day}$ 으로 하여 0.2 %가 되게 첨가 하였으며, 고용량 섭취시 효과를 보기 위하여 2 % 가 되게 식이에 첨가하여 실험을 병행하였다.

실험의 그룹은 Table 7.2와 같다.

Table 7.1 Composition of the high-fat diets

	Original method	
	Paper(g/kg)	Calorie(kcal)
Casein	250	1000
Coconut oil	160	1440
Rice flour	371	1484
cellulose	75	
Wheat bran	75	
Choline chloride	3	
Cholesterol	1	
Vitamin Mix	10	
Mineral Mix	35	
Potassium bicarbonate	20	
Total	1000	3924

Table 7.2 Experimental design of animals

Group	Diet
C	High-fat diet
DGT 0.2	High-fat diet + DGT 0.2 %
DGT 2	High-fat diet + DGT 2 %
GT 0.2	High-fat diet + GT 0.2 %
GT 2	High-fat diet + GT 2 %

## 2) 실험동물 및 실험디자인

실험동물은 체중 100g 정도 되는 6 ~ 8 주 주령의 Golden syrian hamster 수컷을 대한바이오링 크 실험동물 센타로부터 분양 받아 일주일간 적응 사육시킨 후 체중에 따른 난괴법에 의하여 각 군당 8마리씩 5군으로 나누어 총 5주 동안 사육하였다. 동물사육실의 온도는 20~22℃, 습도50%, 채광은 12시간 명암 조명(07:00~19:00)을 유지하였으며 물과 식이는 자유급식을 시켰으며, 체중과 식이섭취량은 일주일에 2회 측정하였다.

## 3) 동물처리



실험동물을 12시간 동안 절식시키고 에테르로 마취시킨 후 도살하고, 심장박동이 멈추지 않은 상태에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 3000rpm, 4℃에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고 기타 장기 특히 간 등은 혈액 채취후 즉시 적출하여 생리식염수로 세척, 여과지로 수분을 제거한 후 무게를 측정하였다. 장기와 혈청시료는 분석전까지 -70℃에 보관하였다.

#### 4) Serum total Cholesterol 측정

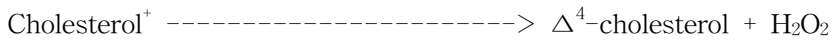
##### 가) 원리

##### 1) Enzymatic colorimetric test

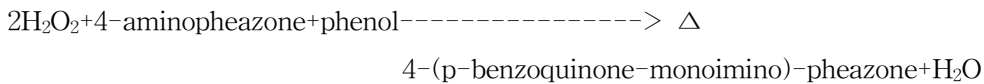
##### 2) Cholesterol esterase



##### Cholesterol oxidase



##### Peroxidase



##### 나) 측정

##### 1) Cholesterol Reagents kit 사용

##### 2) Kit 제조사: Bayer

##### 3) 방법

- Cholesterol Reagents 3 ml과 샘플 혈청 0.02 ml을 잘 혼합하여 37 °C에서 5분간 방치한다.
- 500 nm에서 흡광도를 측정한다.

##### 다) 분석장비

##### 1) 분석기명: 자동생화학 분석기

##### 2) 모델명: ADVIA 1650

##### 3) 제조국: 일본

#### 5) Serum HDL cholesterol 측정

##### 가) 원리

- 1) Cholesterol esterase와 cholesterol oxidase로 chylomicron, VLDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol을 제거한다.
- 2) 효소 시약으로 surfactant로 HDL-Cholesterol 분리 후 측정한다. 단 1단계의 Catalase는 효소 시약 중의 sodium azide에 의해 억제된다. Trinder reaction중에 생성된 Quinoneimine dye의 세기는 596nm에서 측정된 cholesterol농도와 비례한다.

나) 측정

- 1) HDL-C II Reagent kit 사용
- 2) Kit 제조사: Bayer
- 3) 방법
  - 혈청 0.2 ml과 분리시약 0.2 ml을 잘 혼합하여 10분간 실온에 방치한 후, 3000 rpm에서 10분간 원심분리한다.
  - 상청 0.1 ml에 효소시액 3.0 ml과 잘 혼합하여 37 °C에서 5분간 방치한다.
  - 596 nm에서 흡광도를 측정한다.

다) 분석장비

- 1) 분석기명: 자동생화학분석기
- 2) Model명: ADVIA 1650
- 3) 제조국: 일본

6) Serum LDL cholesterol 측정

가) 원리

: Low density lipoprotein을 제외한 나머지 lipoprotein과 관련된 콜레스테롤을 제거한다. Selective surfactant는 non-LDL particle로부터 콜레스테롤을 우선적으로 분리한다. 효소 시약에 있는 다른 surfactant는 Low density lipoprotein으로부터 콜레스테롤을 분리해내고, sodium azide는 catalase를 억제한다. 여기서 생성된 hydrogen peroxide는 Trinder endpoint를 사용하여 정량화된다.

- 1) Cholesterol ester + Cholesterol esterase → Cholesterol + fatty acid  

$$\text{Cholesterol} + \text{O}_2 + \text{Cholesterol Oxidase} \rightarrow \text{Cholestenone} + \text{H}_2\text{O}_2$$
- 2) Cholesterol ester + Cholesterol esterase → Cholesterol + fatty acid  

$$\text{Cholesterol} + \text{O}_2 + \text{Cholesterol Oxidase} \rightarrow \text{Cholestenone} + \text{H}_2\text{O}_2$$

$$\text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{-aminoantipyrine} + \text{TOOS} + \text{peroxidase} \rightarrow \text{quinoneimine pigment} + 4 \text{H}_2\text{O}$$

Where TOOS = N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline.

나) 측정

1) Direct LDL-Cholesterol II Reagent kit 사용

2) Kit 제조사: Bayer

3) 방법

• 혈청 0.2 ml과 분리시약 0.2 ml을 잘 혼합하여 10분간 실온에 방치한 후, 3000 rpm 에서 10분간 원심분리한다.

• 상청 0.1 ml에 효소시액 3.0 ml과 잘 혼합하여 37 °C에서 5분간 방치한다.

• 600 nm에서 흡광도를 측정한다.

다) 분석장비

1) 분석기명: 자동생화학분석기

2) Model명: ADVIA 1650

3) 제조국: 미국

Table 7.3 Effects of DGT and GT extracts on serum lipid levels of hamsters (Unit : mg/dL)

Group	Total cholesterol	HDL-cholesterol	LDL-cholesterol
C	201 ± 20.1	59 ± 21.0	48.1 ± 2
DGT 0.2	199 ± 26.3	104.1 ± 16.2	25.3 ± 9.45
DGT 2	200 ± 25.4	108 ± 15.8	23.2 ± 4.2
GT 0.2	201 ± 26.8	101 ± 30.8	29.5 ± 15.1
GT 2	198 ± 33.5	104 ± 20.3	26.1 ± 10.6

Values are expressed as mean ± SD (n=7)

C : High-fat diet

DGT 0.2 : High-fat diet + DGT 0.2 %

DGT 2 : High-fat diet + DGT 2 %

GT 0.2 : High-fat diet + GT 0.2 %

GT 2 : High-fat diet + GT 2 %

녹차 추출물을 투여한 결과 나타난 혈청 지질은 Table 3과 같다. 녹차 추출물 투여군(DGT 0.2, DGT 2, GT 0.2, GT 2)의 총콜레스테롤 함량은 대조군(C)에 비해 큰 차이는 나타내지 않았다.

HDL-cholesterol 함량은 녹차 추출물 투여군 모두에서 대조군에 비해 약 50% 이상 증가하였으며, 또한 비례되는 결과로 LDL-cholesterol 함량은 녹차 추출물 투여군 모두에서 대조군에 비해 약 50% 이상 감소하는 경향을 나타내었다. 대조군에서 총콜레스테롤 수치가 150 mg/dL 이상 나타내는 것으로 보아 식이 내에 콜레스테롤 첨가와 고지방 함량에 의해 고지혈증이 유발되었다고 할 수 있다.

고지방식이로 콜레스테롤의 섭취량이 많아지면 LDL이 혈관내의 순환시간이 연장되므로 혈관내 피세포벽에서의 화학적 산화를 받을 기회가 많아지게 된다. 이 때 산화된 LDL은 죽상동맥경화증의 초기 병변을 일으켜 혈관 내피세포를 손상시키고 혈소판을 응집하게 된다. 혈소판의 응집이 진행됨에 따라 PDGF(platelet-derived growth factor) 등에 의해 세포증식이 증가되고 내막손상을 촉진시키게 되어 지질을 함유하는 섬유상 플라그를 형성하여 동맥경화증을 유발시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 HDL-cholesterol의 감소와 LDL-cholesterol의 증가된 결과가 고지혈증, 동맥경화증을 비롯한 심혈관 질환의 악화에 기여하고 있다.

DGT 투여그룹은 대조그룹은 물론 GT 투여그룹에 비하여 높은 HDL-cholesterol 수치와 낮은 LDL-cholesterol 수치를 나타내는 것으로 보아 탈카페인된 녹차 추출물이 혈중 콜레스테롤을 낮추는데 더 효과적인 것으로 판단된다. 위 결과에 비추어 녹차 추출물의 투여에 대하여 LDL-cholesterol의 감소와 상대적으로 HDL-cholesterol의 증가는 고지방, 고칼로리 섭취에 따른 성인성 질환의 예방과 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

#### 나. 콜레스테롤 섭취 rat에 대한 thiobarbituric reactive substances(TBARS)의 억제활성 평가

고지방식이로 콜레스테롤의 섭취량이 많아지면 우리 몸안의 지질 함량은 늘어나고 상대적으로 많이 생성된 또는 축적된 지질에 대해서 생체메커니즘에 의해 산화반응이 일어나 그렇지 않은 정상군에 비해 많은 지질과산화물을 생성하게 되고, 이렇게 생성된 지질과산화물은 다시 생체메커니즘에 관여해 많은 산화생성물을 생성하게 해 생명체에 안 좋은 영향을 끼치게 된다.

TBAR 측정은 지방의 산패가 진행됨에 따라 생성되는 carbonyl 화합물 중 malonaldehyde(MDA)의 생성에 근거를 둔 것으로서 MDA는 두분자의 TBA와 한분자의 MDA가 반응하여 적자색의 복합체를 형성하는 것을 측정하는 방법이다.

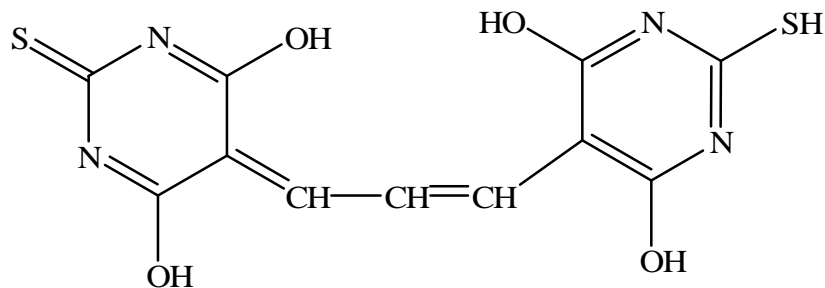


Fig. 7.9. The structure of TBA malonaldehyde complex.

간 조직을 homgenizer을 이용하여 1.15M KCl buffer에서 잘 마쇄 한 다음, 그 상등액 0.5 ml에 TCA (trichloroacetic acid) buffer (0.25 N HCl, 15% trichloroacetic acid, 0.375% thiobarbituric acid, 0.01% butyl hydroxytoluene) 0.5ml을 첨가하여 잘 혼합 한다음 95°C수조에서 30분 동안 끓인 후 상온으로 식혀서 n - butanol을 넣고 격렬히 흔들여 준다. 원심분리(800 rpm, 10 min) 후 상층액은 excitation 515 nm와 emission 552 nm 에서 형광분석기를 이용하여 측정하였다. Thiobarbituric acid reactive substance (TBARs)는 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP)의 산에 의한 가수분해로 얻어진 MDA equivalent의 표준곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를 MDA 농도(pmol / mg protein)로 표기하였다.

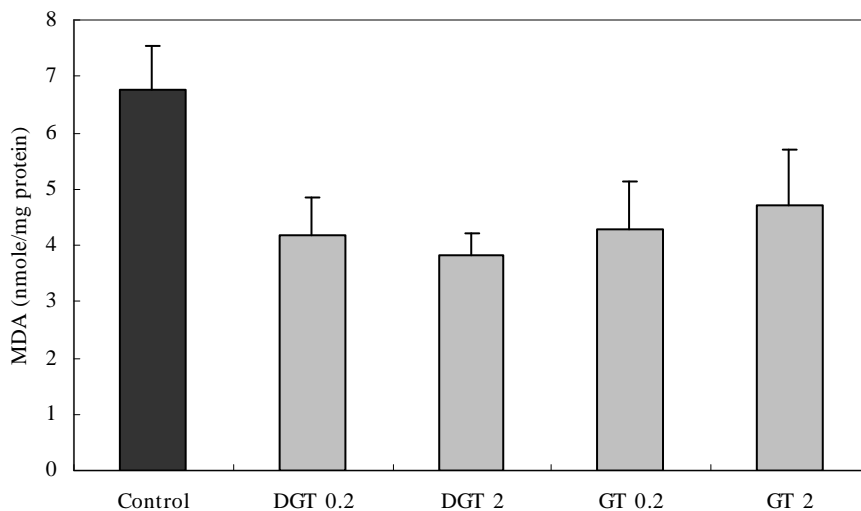


Fig. 7.10. Liver malondialdehyde level in hamster fed high-fat diet with DGT and GT extracts  
Values are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3)

C : High-fat diet

DGT 0.2 : High-fat diet + DGT 0.2 %

DGT 2 : High-fat diet + DGT 2 %

GT 0.2 : High-fat diet + GT 0.2 %

GT 2 : High-fat diet + GT 2 %

MDA는 지질과산화물가의 대표적인 마커로 잘 알려져 있다. Fig. 7.10.은 햄스터에 고지방식이와 함량에 따른 DGT, GT를 5주간 섭취 시킨 후 얻은 간에서 지질과산화물의 함량을 측정한 결과이다. 처리 그룹은 high-fat diet 투여군과 High-fat diet + DGT 0.2 %, High-fat diet + DGT 2 %, High-fat diet + GT 0.2 %, High-fat diet + GT 2 % 그룹으로 나누어진다. High-fat diet는 많은 지질 및 콜레스테롤을 함유하는 식이이다. 실험 결과를 보면 High-fat diet 그룹은 많은 MDA를 생성한 것을 나타내고 있으며, 그에 반해 DGT와 GT를 투여한 그룹은 대조군에 비해 약 40% 이상 감소한 결과를 나타낸 것을 볼 수 있다. 특히 DGT 그룹은 GT 그룹에 비해 19% 정도 더 낮은 MDA 생성비율을 보였다. 이들 결과를 토대로 DGT와 GT의 식이는 우리 몸 안에서 지

질과산화물의생성을 줄여주는 것을 추정 할 수 있으며, 일반 녹차에 비해 탈카페인된 녹차가 지질과산화물의 생성을 감소시켜 준다는 것을 추정 할 수 있다.

## 제 8 절 녹차엽의 휘발성 향미성분의 추출법 및 분석법 확립

### 1. 녹차엽의 휘발성 향미성분의 추출법 확립

#### 가. 시료조건

녹차엽은 물에 우려내는 방법에 따라 성분 조성이 변화하여 차의 맛과 향에 차이를 가져왔다. 본 실험에서는 녹차 엽의 향미성분 추출, 분석을 위해 녹차 엽을 60℃ 증류수에 3분 동안 우려내는 시료조건을 선정하였다. 이 시료조건 선정을 위해서 일반적인 녹차 엽 음용시의 온도 범위 중 60℃, 80℃의 두 온도를 선택하여 3분 동안 우려낸 조건으로 실험하였다. 그 결과, 60℃에서 우려낸 조건이 녹차 엽 음용 시 실제적으로 코로 느끼는 향미성분과 유사할 것으로 추정되어 이 조건을 선정하였다. 또, 녹차 엽의 휘발성 향미성분 분석을 위한 효율을 결정하는 과정에서 녹차 엽을 분쇄하여 실험하여 보았다. 분쇄 시 휘발성 향미성분의 효율은 높아졌으나 분쇄과정에서의 녹차 엽의 산화 등의 변화 가능성이 있고, 음용 시와는 다른 조건이므로 분쇄보다는 시료의 양을 늘려 효율을 높이는 방법을 선택하였다.

#### 나. 추출방법

본 연구에서는 녹차엽의 휘발성 향미성분을 분석하기 위하여, static Headspace Extraction, 고체상미세추출법 (Solid Phase Microextraction, SPME), 고진공승화법 (High Vacuum Sublimation, HVS), 동시용매증류추출법(Simultaneous steam Distillation/solvent Extraction, SDE) 등의 4가지 추출방법이 사용되었다.

##### 1) Static Headspace Extraction

이 방법은 다른 추출방법들에 비해 비교적 추출효율이 낮아, 녹차의 휘발성 향미성분을 분석하는 방법으로는 적합하지 못했다.

##### 2) 고체상미세추출법 (Solid Phase Microextraction, SPME)

녹차엽의 휘발성 향미성분의 추출을 위한 본 연구에서는 50/30 $\mu$ m의 divinylbenzene/carboxen/polymethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fiber(Supelco, Bellefonte, USA)가 사용되었다. 녹차엽 20g을 60℃ 증류수 200mL에 3분 동안 우려낸 후 면포를 이용하여 녹차 엽을 제거 한 물을

40ml의 SPME bottle에 나누어 담았다. Bottle 입구를 silicon/Teflon septum으로 봉하고, 40°C 중탕으로 45분간 평형 시켰다. 평형이 끝나면 silicon/Teflon septum에 fiber를 넣어 20분간 휘발성 성분을 흡착시켰다. 흡착된 fiber는 GC-MS의 200°C injector port에 5분간 cryofocusing을 한 후 탈착시켰다 (Fig. 8.1).

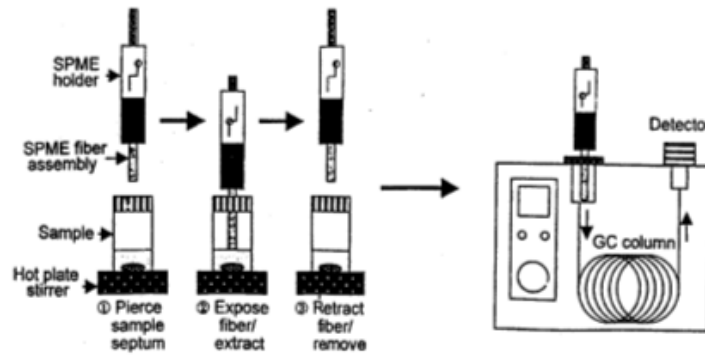


Fig. 8.1. Extraction process by SPME and desorption system for GC analysis (Kataoka et al., 2000).

### 3) 고진공승화법 (High Vacuum Sublimation, HVS)

녹차엽 50g을 60°C의 증류수 500ml에 3분 동안 우려낸 후 면포를 이용하여 녹차 엽을 제거하였다. 녹차 엽이 제거된 물과 100ml의 dichloromethane을 혼합하여 30분간 stirring 시킨 뒤 분액여두를 이용하여 원심분리기 tube에 나누어 담았다. 원심분리기 (2800rpm, 20분, 4°C)에 의해 분리된 침전물은 제거하고, 휘발성 성분이 녹아있는 용매 부분은 sodium sulfate로 수분을 제거한 후 HVS를 이용하여 추출하였다. 추출된 용매는 질소 농축을 하여 final volume 0.1ml까지 맞춘 후 syringe로 0.1 $\mu$ l을 취하여 GC-MS에 injection 하였다 (Fig. 8.2).

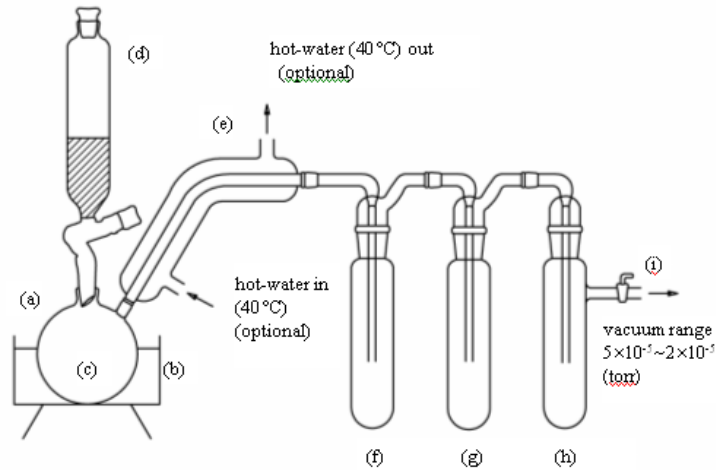


Fig. 8.2. High vacuum sublimation apparatus (Sen et al., 1991). (a) two-necked distillation flask; (b) water bath; (c) magnetic stirrer; (d) addition funnel; (e) tube with water jacket which was held by a thermostat at the temperature of the water bath; (f-h) traps cooled with liquid nitrogen; (i) pump system which includes a rotary vacuum pump and an oil diffusion pump (ULVAC KIKO, Inc., Yokohama, Japan).

4) 동시용매증류추출법(Simultaneous steam Distillation/solvent Extraction, SDE)

물보다 비중이 무거운 dichloromethane을 한 쪽 둥근 플라스크에 50 ml 넣고, 다른 편에는 1L 둥근 플라스크에 녹차엽 50g을 60°C 증류수 500ml에 3분 동안 우린 녹차물을 넣었다. Likens-Nickerson apparatus (Fig. 8.3)를 이용하여 동시에 연속적으로 2시간 동안 추출한 후 sodium sulfate로 수분을 제거하고 final volume 0.1 ml까지 질소 농축하여 0.1 $\mu$ l을 취한 후 GC-MS에 injection 하였다.

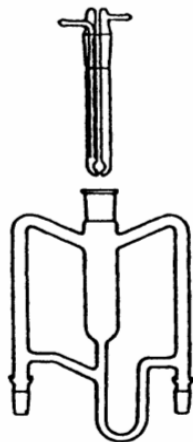


Fig. 8.3. Simultaneous steam distillation and extraction (SDE) apparatus modified (Parliament, 2002).



## 2. 녹차엽의 휘발성 향미성분 및 향기활성성분 분석

### 가. 녹차엽의 휘발성 향미성분 분석

녹차엽의 휘발성 향미성분은 Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)에 의하여 분석되었다. GC-MS는 HP 5980A series II GC/HP 5972 mass selective detector(Hewlett-packard Co., USA), FID(Flame Ionized Detector)로 수행하였으며, column은 DB-5ms(30m length x 0.25mm i.d. x 0.25  $\mu$ m film thickness, J&W scientific, Folsom, CA, USA)를 사용하였다. Oven의 온도는 40 $^{\circ}$ C에서 3분간 유지시킨 후 분당 4 $^{\circ}$ C씩 올려 200 $^{\circ}$ C에서 5분간 유지시켰다. Injector와 detector의 온도는 각각 200 $^{\circ}$ C, 250 $^{\circ}$ C 이며, 나머지 mass selective detector의 조건은 ionization energy, 70eV ; mass range, 33-550 a.m.u.; scanning rate, 1.4 scans/s 와 같다. 이동상 기체는 helium 으로 유속은 0.8ml/min을 유지하고, splitless mode를 사용하였다.

### 나. 녹차엽의 휘발성 향미성분의 정성 및 정량분석

GC-MS에 의해 얻어진 mass spectrum은 Wiley library 275.I에 의하여 manual search한 후 그 retention index (RI)를 비교하여 동정 하였다. RI는 화합물의 동정을 위해 GC chromatogram에서 확인된 C<sub>7</sub>-C<sub>22</sub>의 n-paraffins 표준물질의 retention time을 통해 구했다. 정량은 동정된 peak area의 면적과 전체 peak area를 비교하여 나타내었다. 최적화된 추출법을 이용한 녹차엽의 휘발성 향미성분은 보다 정확한 정량을 위해 내부표준물질 (0.1ml of 100 ppm geranyl acetone)을 사용하여 그 값을 계산하였다.

### 다. 녹차 엽의 향기활성성분 분석

향추출물 희석분석법 (aroma extract dilution analysis, AEDA)을 사용하여 GC-Olfactometry (GC-O)로 sniffing test를 실시하여 분석하였다. 이 분석방법은 추출에 사용한 동일한 용매로 최종 추출물을 일정한 1:2의 배수로 희석하여, 각 희석물을 대상으로 향이 나지 않는 희석배수까지 GC-O를 수행하여 더 이상 향이 나지 않는 희석배수 직전의 희석배수를 flavor dilution (FD) factor로 나타내어 FD factor가 높은 화합물을 휘발성 향기활성성분으로 결정하는 방법이다.

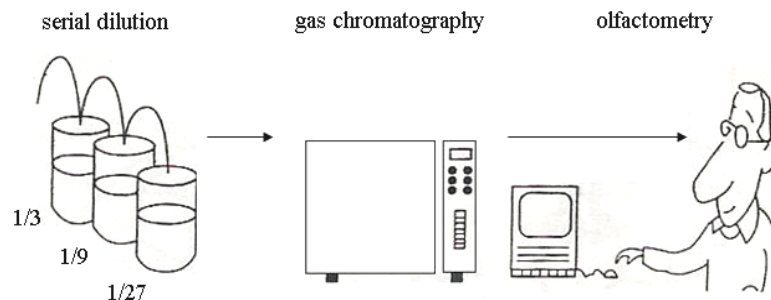


Fig. 8.4. Schematic of AEDA system (ref)

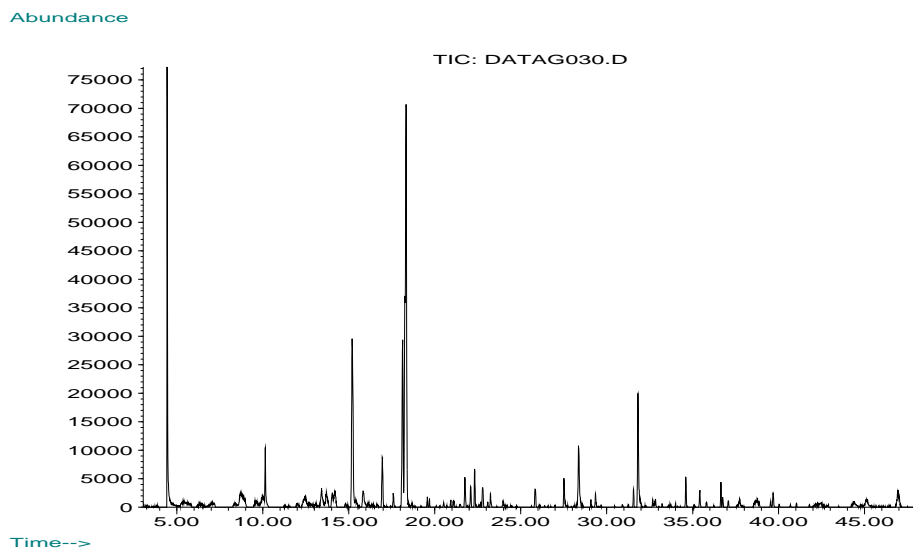
### 3. 녹차엽의 휘발성 향미성분 및 향기활성성분 분석

#### 가. 녹차엽의 휘발성 향미성분 분석을 위한 추출법 확립

녹차엽의 휘발성 향미성분 분석을 위한 최적 추출법 확립을 위하여, 다양한 추출방법을 사용하여 녹차엽의 휘발성 향미성분을 분석하였다 (Fig. 8.5) (Table 8.1, 2, 3).

고체상미세추출법 (SPME)은 static headspace나 dynamic headspace extraction과 마찬가지로, 녹차엽의 휘발성 향미성분을 추출하는 데 있어서는 상대적으로 낮은 추출효율을 보였다 .

한편, 고진공승화법 (HVS)은 녹차엽에서 총 42개의 휘발성 향미성분을 추출해내는 등 추출효율은 상대적으로 높은 편이었으나, 우린 녹차물과 용매 혼합액을 stirring 시킨 후 분리하는 과정에서 emulsion과 foaming 현상을 일으켜 최적의 추출방법으로 결정하기에 무리가 있었다. 이러한 추출 방법들에 비하여, 동시용매증류추출법 (SDE)은 녹차엽 음용 시 물에 우려내는 방법과 유사한 방법으로, 본 실험에서 녹차엽의 휘발성 향미성분을 분석하는데 적합한 추출 방법으로 결정되었다.



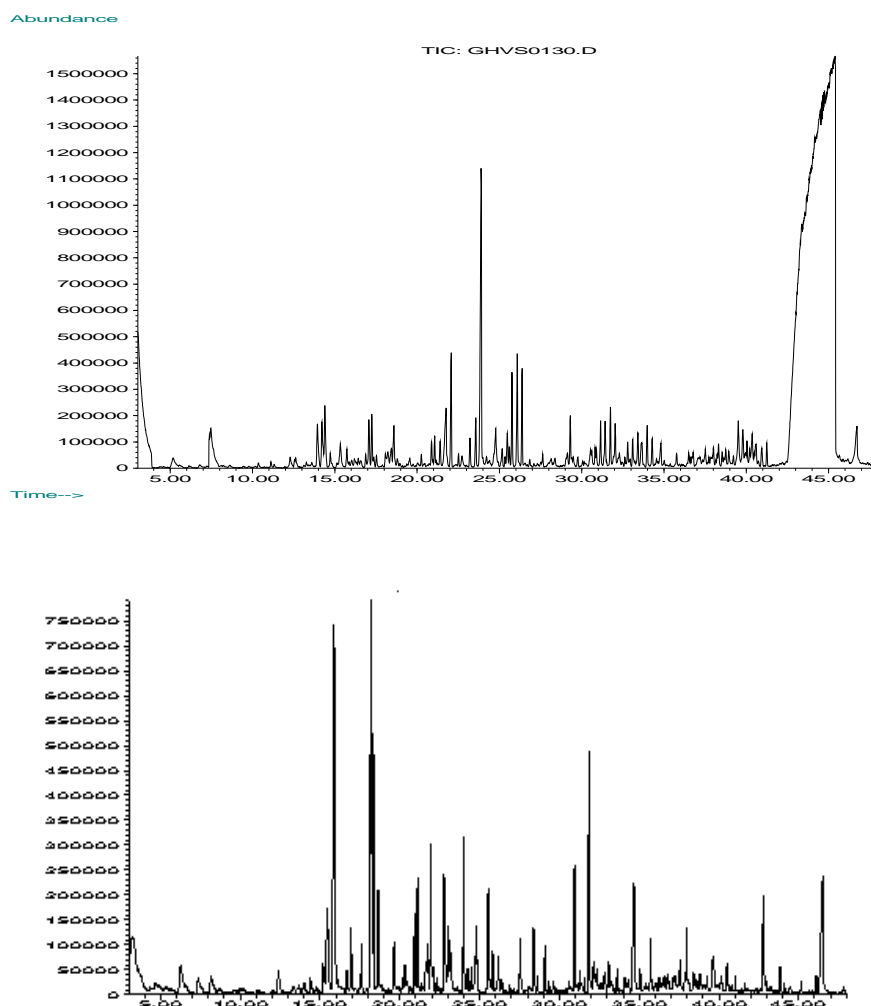


Figure 8.5. GC-MS total ion chromatogram of green tea infusion volatiles isolated by SPME, HVS, and SDE, respectively.

Table 8.1. Volatile compounds in green tea infusion isolated by SPME

No.	Compounds	SPME		ID <sup>d</sup>
		R.I <sup>a</sup>	P.A <sup>b</sup> (%)	
1	decane	1000	0.53	MS/RI
2	2-ethyl-1-hexanol	1031	4.10	MS/RI
3	limonene	1034	0.38	MS/RI
4	phenylacetaldehyde	1054	0.47	MS/RI
5	linalool oxide	1099	0.87	MS/RI
6	linalool	1101	2.48	MS/RI
7	hotrienol	1103	1.91	MS/RI
8	nonanal	1104	5.77	MS/RI
9	butanoic acid	1069	0.79	MS
10	1,2-dimethyl-cyclooctane	1080	1.10	MS

a Retention indices were determined using n -paraffins C7-C22 as external references.

b Average of relative percentage of peak area in MS total ion chromatogram.

c Average of relative percentage of peak area in internal standard (0.1ml of 100ppm geranyl acetone)

peak area.

d Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectrum database (1995) (HewlettPackard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures (Kondjoyan and Berdague, 1996; Acree, 1997); MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.

Table 8.2. Volatile compounds in green tea infusion isolated by HVS

No.	Compounds	HVS		ID <sup>d</sup>
		RI <sup>a</sup>	P.A.(%) <sup>b</sup>	
<b>Alcohols</b>				
1	benzyl alcohol	1031	0.25	MS/RI
2	(Z)-linalool oxide	1069	0.09	MS/RI
3	(E)-linalool oxide	1084	0.08	MS/RI
4	hotrienol	1101	0.14	MS/RI
5	phenylethyl alcohol	1110	0.33	MS/RI
6	epoxylinalol	1168	0.13	MS
7	3,7-dimethyl-1,5-octadien-3,7-diol	1190	0.68	MS/RI
8	5-hydroxylinalol	1255	0.08	MS
9	2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol	1502	0.12	MS
<b>Carbonyls</b>				
10	phenylacetaldehyde	1041	0.13	MS
11	3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one	1107	0.18	MS
12	(Z)-jasmone	1390	0.07	MS/RI
13	coumarin	1433	0.15	MS/RI
14	hydroxy-6-cytosine	1589	0.18	MS
<b>Aliphatic hydrocarbons</b>				
15	2,4-dimethyl-heptane	816?	0.06	MS/RI
16	4-methyl-nonane	958?	0.13	MS
17	decane	998?	0.38	MS/RI
18	4-methyl-decane	1009	0.48	MS
19	undecane	1098	0.12	MS
20	5-methyl-undecane	1152	0.06	MS/RI
21	dodecane	1198	0.64	MS/RI
22	4,8-dimethyl-undecane	1210	0.06	MS
23	4,8-dimethyl-dodecane	1238	0.3	MS
24	tritetracontane	1280	0.14	MS
25	2,6,10,14-tetramethyl-hexadecane	1285	0.05	MS
26	1-octene	1306	0.7	MS
27	n-tetradecane	1397	0.25	MS/RI
28	2-methyl-decane	1452	0.25	MS
29	undecane	1460	0.3	MS
30	pentadecane	1496	0.05	MS/RI
31	1,1,6,6-tetramethylcyclododecane	1539	0.25	MS
32	hexadecane	1596	0.1	MS/RI
33	heptadecane	1695	0.08	MS/RI
<b>N-containing compounds</b>				
34	benzeneacetonitrile	1135	0.08	MS
35	indole	1289	0.23	MS/RI
36	caffeine	1843	5.14	MS/RI
<b>Miscellaneous</b>				

37	dimethyl sulfoxide	832	0.15	MS
38	1-methyl-4-(1-methylethyl)-benzene	1080	0.07	MS
39	1,2,3,4-tetramethylbenzene	1116	0.06	MS
40	1,3-bis(1,1-dimethylethyl)-benzene	1246	2.33	MS
41	tetradecanoic acid	1756	0.07	MS/RI
42	hexadecanoic acid	>1900	0.43	MS/RI

a Retention indices were determined using n -paraffins C7-C22 as external references.

b Average of relative percentage of peak area in MS total ion chromatogram standard deviation.

c Average of relative percentage of peak area in internal standard (0.1ml of 100ppm geranyl acetone) peak area

d Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectrum database (1995) (HewlettPackard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures(Kondjoyan and Berdague, 1996;Acree,1997); MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.

Table 8.3. Volatile compounds in green tea infusion isolated by SDE

No.	Compounds	SDE		ID <sup>d</sup>
		RI <sup>a</sup>	P.A(%) <sup>c</sup>	
<b>Alcohols</b>				
1	benzyl alcohol	1034	1.50±0.17	MS/RI
2	(Z)-linalool oxide	1069	0.68±0.00	MS/RI
3	(E)-linalool oxide	1086	0.58±0.13	MS/RI
4	linalool	1100	5.47±0.34	MS/RI
5	hotrienol	1103	2.13±0.00	MS
6	phenylethyl alcohol	1111	0.89±0.06	MS/RI
7	nerol oxide	1150	0.10±0.00	MS/RI
8	epoxylinolol	1169	0.74±0.07	MS
9	3,7-dimethyl-1,5-octadiene-3,7-diol	1188	0.54±0.04	MS
10	α-terpineol	1195	1.21±0.04	MS/RI
11	nerol	1223	0.44±0.08	MS/RI
12	geraniol	1249	1.43±0.01	MS/RI
13	5-hydroxylinalol	1255	0.21±0.02	MS
14	4-vinyl-2-methoxy-phenol	1308	0.42±0.02	MS/RI
15	5,8-dihydronaphthol	1482	0.30±0.11	MS
16	nerolidol	1557	0.9±0.82	MS/RI
<b>Carbonyls</b>				
17	(Z)-3-hexenal	853	0.40±0.19	MS/RI
18	benzaldehyde	961	0.42±0.05	MS/RI
19	2,4-heptadienal	1009	0.24±0.00	MS/RI
20	2-ethyl-1-hexanol	1028	0.50±0.00	MS/RI
21	phenylacetaldehyde	1044	4.38±0.00	MS/RI
22	1-phenyl-ethanone	1064	0.27±0.03	MS
23	nonanal	1104	2.13±0.00	MS/RI
24	2-phenylpropenal	1154	0.19±0.04	MS
25	β-damascenone	1377	0.12±0.02	MS/RI
26	(Z)-jasmone	1392	0.46±0.01	MS/RI
27	3-buten-1-one	1407	0.14±0.01	MS
28	geranyl acetone	1443	1.00±0.00	IS

29	2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-cyclohexadie	1455	0.16±0.00	MS
<b>Esters and Acids</b>				
30	benzoic acid	1188	0.56±0.04	MS/RI
31	2-methyl-propanoic acid	1347	0.50±0.06	MS
32	butanoic acid	1371	0.63±0.00	MS
33	dodecanoic acid	1560	0.99±0.00	MS/RI
34	methyl jasmonate	1639	0.10±0.00	MS/RI
35	tetradecanoic acid	1767	0.30±0.01	MS/RI
36	1,2-benzenedicarboxylic acid	1900	0.22±0.06	MS
37	hexadecanoic acid	1966	3.16±1.03	MS/RI
<b>Terpene hydrocarbons</b>				
38	α-terpinolene	1083	0.10±0.00	MS
39	theaspirane A	1314	0.11±0.01	MS
40	(Z,Z)-α-farnesene	1591	0.38±0.04	MS

---

No.	Compounds	SDE		ID <sup>d</sup>
		RI <sup>a</sup>	P.A.(%) <sup>c</sup>	
<b>Aliphatic hydrocarbons</b>				
41	3,4-dimethyl-2-pentene	801	0.81±0.00	MS
42	dodecane	1200	0.22±0.01	MS/RI
43	tridecane	1300	0.45±0.00	MS/RI
44	tetradecane	1400	0.09±0.01	MS/RI
45	hexadecane	1600	0.11±0.03	MS/RI
46	heptadecane	1700	0.23±0.04	MS/RI
47	octadecane	1800	0.09±0.04	MS/RI
<b>N-containing compounds</b>				
48	benzeneacetonitrile	1137	0.56±0.06	MS
49	indole	1290	1.16±0.02	MS/RI
50	caffeine	1842	1.22±0.00	MS/RI

a Retention indices were determined using n -paraffins C7-C22 as external references.

b Average of relative percentage of peak area in MS total ion chromatogram±standard deviation.

c Average of relative percentage of peak area in internal standard (0.1ml of 100ppm geranyl acetone) peak area

d Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectrum database (1995) (HewlettPackard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures(Kondjoyan and Berdague, 1996;Acree,1997); MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.

#### 나. 녹차엽의 휘발성 향미성분

녹차엽의 휘발성 향미성분 분석을 위한 최적 추출법 확립을 위하여, 다양한 추출방법을 사용한 결과 동시용매증류추출법이 추출효율이 가장 높아 이 방법을 선택하였다 (Table 8.3). 이 추출방법에 의해서는 약 50개의 화합물이 동정되었으며 이 중 녹차의 주요 향미성분으로는 16개의 alcohol, 12개의 cabonyl 등이 추출되었다. 그리고 7개의 esters and Acids, 3개의 terpen hydrocarbons, 6개의 aliphatic hydrocarbons, 3개의 N-containing compounds이 동정 정량 되었다. 특히, 녹차의 주요 향기활성성분으로 알려진 linalool, geraniol, α-terpineol과 같은 향기성분이 다른 추출법에 비해 많이 정량되었다. 반면 Caffein, benzene 등은 다른 추출법에 비해서 적게 정량

되었다.

#### 다. 녹차엽의 향기활성성분

Table 8.4는 SDE-GC-O에 의한 녹차엽의 향기활성성분과 향기 특성을 보여주고 있었다. 총 18개의 향기활성성분이 동정되었으며, 이 중 (No. 6, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 18)은 GC-MS, RI값, 향 특성을 통해 동정되었다. 향 특성은 가지고 있지만 그에 맞는 화합물이 미동정된 것들이 많았다. 녹차엽의 향기활성성분은 풀향 (No. 1, 10), 구수한 향(No. 4, 5, 9, 11), 과일향 (No. 12)으로 높은 FD factor를 가지고 있었다. 녹차 엽의 향기활성성분 중 향긋한 특성을 가진 fruity와 floral 향을 나타내는 linalool,  $\alpha$ -terpineol, geraniol 과 같은 성분이 동정되었으며, 녹차 엽에서 느낄 수 꽃내와 잔디를 잘랐을 때 나는 향 특성을 갖는 물질도 동정되었다. 또, 구수한 향미 성분을 나타내는 benzyl alcohol이나 linalool oxide와 같은 향이 동정되었다. 이는 튀음 차인 녹차 시료의 특성상 가공과정에서 생길 수 있는 향 특성으로 추정되었다. 녹차 엽의 주요 향기활성성분은 풀 향, 구수한 향, 꽃 향, 과일 향 등이며, 이는 녹차 엽 자체가 가지고 있는 향 성분과 녹차 엽을 가공하는 과정에서 생기는 향이 부가되어 혼합된 향 특성을 나타내었다.

Table 8.4. Aroma-active compound detected in SDE-GC-O

No.	Compound name	RI <sup>a</sup>	Aroma property	log <sub>3</sub> FD <sup>b</sup>	ID <sup>c</sup>
1	hexanal	801	cut grass	3.5	RI/SN
2	unknown	841	metallic	2.5	RI/SN
3	unknown	867	fermented soybean	3	RI/SN
4	unknown	909	boiled chestnut	3	RI/SN
5	unknown	923	baked rice	5	RI/SN
6	benzaldehyde	941	bitter, almond	6	MS/RI/SN
7	unknown	981	mushroom	3.5	RI/SN
8	unknown	985	metallic	4	RI/SN
9	benzyl alcohol	1027	baked	3	MS/RI/SN
10	phenylacetaldehyde	1045	green	5.5	MS/RI/SN
11	linalool oxide	1092	bake	3	MS/RI/SN
12	linalool	1097	fruity	5.5	MS/RI/SN
13	hotrienol	1157	floral	2	MS/RI/SN
14	unknown	1165	cucumber	3.5	RI/SN
15	$\alpha$ -terpineol	1176	floral	3	MS/RI/SN
16	unknown	1181	phenolic	4.5	RI/SN
17	geraniol	1225	floral	2	MS/RI/SN
18	nerolidol	1567	fresh	2.5	MS/RI/SN

a Retention indices were determined using n-paraffins C7-C22 as external references.

b Averages of log<sub>3</sub> (flavor dilution factor) by two panelists.

c Tentative identification was performed as follow; MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database(1995, HewlettPackard Co., Palo Alto, CA, USA), RI, retention index was consistent with that of the literatures(Kondjoyan and Berdague, 1996;Acree,1997); SN, odor property perceived at sniffing port.

## 제 9 절 초임계 이산화탄소에 의해 탈카페인된 녹차엽의 휘발성 향미성분 분석

### 1. 확립된 추출법과 분석방법을 이용한 녹차엽의 휘발성 향미성분 분석을 위한 실험조건

#### 가. 녹차엽

초임계 이산화탄소를 이용한 카페인 제거 시 분쇄된 녹차엽 사용이 효율을 높여줌에 따라 비교 대상이 될 control 시료 역시 탈카페인 시료와 같은 조건으로 막자사발을 이용하여 분쇄한 후 1.0 mm 체를 통과한 것을 사용하였다. 초임계 이산화탄소에 의해 탈카페인된 정도가 다른 3개의 시료는 C60 (60% 탈카페인 처리된 녹차), C35 (35% 탈카페인 처리된 녹차), C10 (10% 탈카페인 처리된 녹차)이며, 이 3종류의 녹차엽 시료는 초임계 이산화탄소 처리 후 co-solvent로 사용된 에탄올을 제거하기 위하여 진공오븐 (Isotemp Model 280A, Fisher Scientific, NJ, USA)에서 50°C로 3 시간 동안 수행하였다.

#### 나. 녹차엽의 휘발성 향미성분 추출

Control 시료(카페인 제거되지 않은 녹차)와 탈카페인된 정도가 다른 3개의 녹차시료 (C60, C35, C10)는 각각 50g씩 70 °C 증류수 500 mL에 3분 동안 우려낸 후 면포 (다시백, T&C electronics, 의왕시, 경기도, 한국)를 이용하여 걸러냈다.

녹차엽의 휘발성 향미성분 분석을 위해 1차년도에서 최적의 추출방법으로 결정된 동시용매재증류 장치법 (SDE)을 이용하여 2시간동안 추출하였다. 이때 사용된 용매는 dichloromethane (50mL)이며, SDE 추출 전에 휘발성향미성분 정량을 위하여 내부표준 물질인 geranyl acetone [500 ppm (v/v) in dichloromethane]을 0.3mL 넣어 주었다. 추출이 끝나면 sodium sulfate로 수분을 제거하고, final volume 0.1mL까지 질소 농축한 후 1 $\mu$ L를 GC-MS에 주입하였다.

#### 다. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

SDE를 사용하여 추출한 녹차엽의 휘발성 향미성분은 GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)에 의하여 분석되었다. GC-MS는 HP 5890A series II GC/HP 5972 mass selective detector(Hewlett-packard Co., USA), FID(Flame Ionized Detector)로 수행하였으며, column은 DB-5ms(30 m length x 0.25 mm i.d. x 0.25  $\mu$ m film thickness, J&W scientific, Folsom, CA, USA)를 사용하였다. Oven의 온도는 40°C에서 3분간 유지시킨 후, 분당 4°C씩 올려 250°C에서 5분간 유지시켰다. Injector와 detector의 온도는 각각 200°C, 250°C 이며, 나머지 mass selective detector의 조건은 ionization energy, 70eV ; mass range, 33-550 a.m.u.; scanning rate, 1.4 scans/s와 같았다. 이동상 기체는 helium으로 유속은 0.8 mL/min을 유지하고, splitless mode를 사용하였다.



#### 라. 녹차엽의 향미성분 분석

녹차 엽의 휘발성향미성분은 GC-MS에 의해 동정 및 정량 하였다. GC-MS에 의해 분석된 녹차 엽의 휘발성 향미성분은 RI(Retention index)값과 GC-MS의 Wiley library 275.I 및 mass spectrum data를 근거로 동정하였고, authentic compounds를 사용하여 확인하였다. 정량은 내부표준물질(0.3 mL of 500 ppm geranyl acetone)의 peak area에 대한 동정 화합물의 peak area의 percentage로 계산하여 나타내었다.

#### 마. 녹차엽의 향기활성성분 분석

탈카페인 녹차 엽의 향기활성성분 분석은 control(C100) 시료와 카페인이 가장 많이 제거된 C10 녹차 엽을 사용하여 비교하였다. 녹차 엽의 향미성분 분석과 동일한 조건으로 동시재증류추출법(SDE)을 이용하여 2시간 동안 추출한 후 sodium sulfate로 수분을 제거하고, final volume 0.1 mL까지 질소 농축하였음. 농축된 시료는 dichloromethane을 사용하여 1:3의 희석배수로 희석하면서 GC-O를 수행하였다.

탈카페인 녹차엽의 향기활성성분 분석에 사용된 GC-O는 GC(Varian CP-3800 GC, Walnut Creek, USA)에 flame ionization detector(FID)와 sniffing port (ODO II, SGE Ringweed, Australia)를 설치한 것이었다. GC column의 끝은 FID와 sniffing port 사이에서 1:1로 분지하였으며 이때는 deactivated capillary column (0.5 m length x 0.25 mm i.d.)을 사용하였다. GC oven 온도는 40°C에서 3분 유지한 후 250°C까지 분당 4°C씩 상승시켜 5분 동안 유지하였음. 나머지 실험 조건은 GC/MS의 것과 동일하게 하였다.

## 2. 탈카페인 정도에 따른 녹차엽의 휘발성 향미성분 및 향기활성성분 비교분석

### 가. 탈카페인 정도에 따른 녹차엽의 휘발성 향미성분 비교

Fig.9.1은 탈카페인된 정도에 따른 녹차엽의 휘발성 향미성분을 분석한 GC-MS의 total ion chromatogram의 결과를 나타낸 것이다. Control(C100) 녹차 엽과 탈 카페인 된 녹차 엽의 휘발성 향미성분을 분석한 결과, 총 41개의 화합물이 동정되었으며, 8개의 alcohols, 15개의 terpenes과 oxygenated terpene계 화합물, 10개의 carbonyls, 4개의 질소함유 화합물, 4개의 기타 화합물이 동정 및 정량되었다 (Table 9.1).

녹차의 주요 향미성분으로는 다양한 alcohols 및 aldehydes 화합물이 동정되었다. 특히, linalool이나 geraniol과 같은 terpene계 화합물은 녹차의 휘발성 향미성분에서 대부분을 차지하였다. 녹차는 발효된 차에 비해 구분되는 green note를 가지고 있었다. C<sub>6</sub> alcohols 및 aldehyde 류가 이를 대표하는 물질이며, (*Z*)-3-hexanol, (*E*)-2-hexenol, (*Z*)-3-hexenal, (*E*)-2-hexenal 등이 녹차엽에서 많이 동정되는 것으로 알려져 있었다. 본 연구에서 사용된 녹차 엽에서는 (*E*)-2-hexenal이 가장 많은 양 동정되었으며, 특히 control 시료에서 많은 양이 확인되었다. 이 화합물은 카페인이 제거됨에 따라 그 양이 감소하는 경향을 보였다. 동정된 7개의 aldehydes 중에서는

phenylacetaldehyde가 많이 정량( $10.36 \pm 0.54$ ) 되었다. 이 화합물은 달콤한 꽃향을 나타내며 녹차의 향기성분 중에 좋은 향을 나타내는데 영향을 주는 물질이었다. 구운 감자향을 내는 methional이나 고소한 향을 내는 furfural 등은 녹차의 고소하고 구수한 향을 나타내는 것으로 보였다. 또, 고소한 향에 기여하는 것으로 보이는 기존 논문에서 알려진 pyrazine 및 pyrrole류는 아미노산과 당에 의한 maillard 반응에 의해 생성되는 물질로 녹차 엽을 roasting하는 과정 중에 생성되는 물질로 여겨지나, 본 실험의 GC-MS에 의한 분석에서는 동정 및 정량되지 않았다. 본 실험 결과, 대부분의 녹차엽의 휘발성 향미성분은 카페인을 제거하는 과정에서 손실되며, 카페인이 제거되는 정도가 크면 클수록 더 많은 휘발성 향미 성분이 줄어드는 경향을 보였다. 특히, 상대적으로 non-polar한 물질인 terpene계 화합물은 카페인이 제거되는 정도에 따라 점차적으로 줄어들었다. Linalool의 경우 카페인이 가장 많이 제거된 시료( $11.34 \pm 0.96$ )는 control(C100) 녹차 시료( $3.52 \pm 0.87$ )에 비해 크게 감소하였다. Hotrienol의 경우 linalool보다는 적지만 많은 양 감소되었다. 또, (*E*)-2-hexenal이나 heptanal처럼 상대적으로 분자량이 작은 물질도 카페인이 제거됨에 따라 크게 감소하였다. Moyer(1993)는 non-polar하거나 분자량이 작은 물질은 이산화탄소에 잘 용해됨이고 보고하였다. 따라서 많은 휘발성 향미성분들이 카페인을 제거하는 동안 카페인과 함께 추출되어 나왔을 가능성이 있었다. Heptanal, neroloxide, (*Z*)-jasmone 3-methyl-5-propyl-nonane과 같은 화합물은 control 녹차시료에서만 동정되었으며, 2-ethyl-1-hexenol, furfural, methional, benzaldehyde, 1-phenylethaone은 control 녹차시료에서 많은 양 동정되었다. 이 화합물들 역시 이산화탄소의 선택성 및 용해성과 관련되어 있을 것으로 보였다. 반면에 3-methyl-1-butanol, 3-methyl-2-pentanol은 카페인이 많이 제거된 시료에서 동정되었다. 이 화합물이 C10 녹차엽에서 C35 녹차엽에 비해 더 많은 양이 정량된 것으로 볼 때, co-solvent로 사용된 에탄올의 양과 관련 있는 것으로 생각되었다. 초임계이산화탄소를 이용하여 카페인을 제거하는 추출하는 횟수가 증가함에 따라 그 사용된 에탄올의 양이 증가되기 때문이었다.

따라서, 휘발성 향미성분의 감소에 중요한 영향을 미치는 요인은 초임계이산화탄소를 이용한 카페인 제거 횟수와 co-solvent로 사용된 에탄올의 양이었다. 초임계 이산화탄소는 hexane, pentane과 비슷한 polarity를 가지기 때문에 유기용매가 휘발될 때 휘발성 향미성분도 함께 손실되는 것으로 보였다.

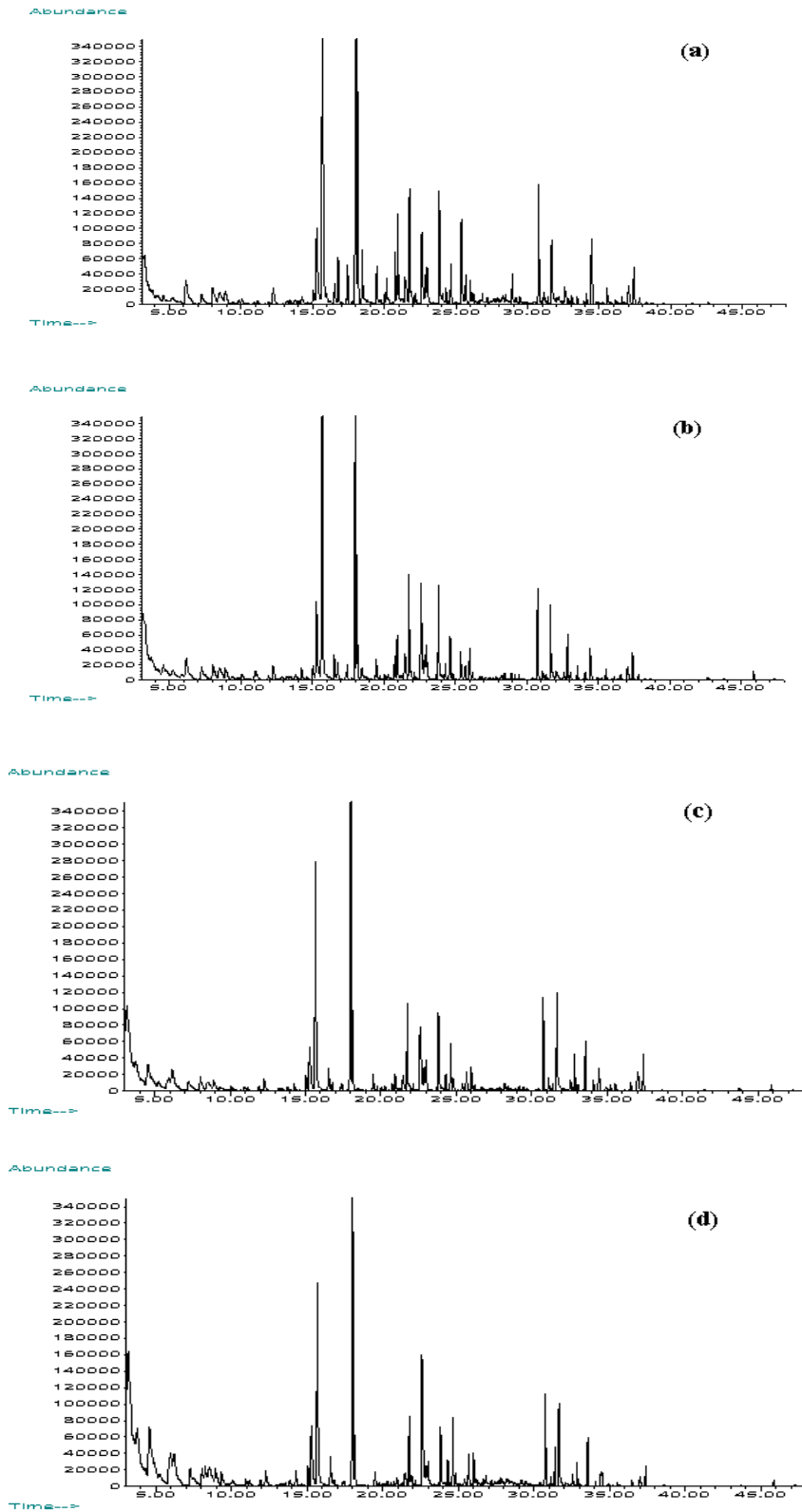


Fig 9.1. GC-MS total ion chromatograms of volatile compounds isolated from control and decaffeinated green teas by SDE. (a) control (not decaffeinated), (b) 60% decaffeinated green tea, (c) 35% decaffeinated green tea, (d) 10% decaffeinated green tea.

Table 9.1. Comparison of volatile compounds in control and decaffeinated green teas

No.	RI <sup>a</sup>	Volatile compounds	Relative peak area (%) <sup>b</sup>				ID <sup>g</sup>
			C100 <sup>c</sup>	C60 <sup>d</sup>	C35 <sup>e</sup>	C10 <sup>f</sup>	
<b>Alcohols</b>							
1	737	3-methyl-1-butanol	- <sup>h</sup>	-	0.80±0.11	2.23±0.41	A
2	792	3-methyl-2-pentanol	-	-	0.39±0.09	1.25±0.24	C
11	1025	2-ethyl-1-hexanol	0.46±0.07	0.28±0.13	0.27±0.02	0.29±0.11	A
12	1030	benzyl alcohol	4.42±0.07	2.12±0.48	1.56±0.62	1.07±0.22	A
20	1107	phenylethyl alcohol	1.82±0.13	0.25±0.10	0.06±0.03	-	A
27	1210	4-vinylphenol	3.19±0.15	2.25±0.40	2.39±1.23	2.03±0.42	B
31	1304	4-vinyl-2-methoxy-phenol	0.75±0.02	0.51±0.13	0.51±0.19	0.44±0.08	B
37	1481	5,8-dihydronaphthol	0.31±0.09	0.28±0.13	0.33±0.01	-	B
<b>Terpenes and Oxygenated terpenes</b>							
15	1067	(E)-linalool oxide	1.12±0.10	0.29±0.13	0.16±0.05	0.08±0.02	A
16	1080	α-terpinolene	0.17±0.03	0.08±0.04	0.07±0.01	0.06±0.02	A
17	1082	(Z)-linalool oxide	0.90±0.09	0.23±0.11	0.11±0.03	0.05±0.02	A
18	1096	linalool	11.34±0.96	5.90±2.61	5.45±1.15	3.52±0.87	A
19	1099	hotrienol	4.09±0.41	1.64±0.72	1.13±0.27	0.60±0.15	B
22	1146	neroloxide	0.26±0.02	-	-	-	B
24	1164	pyranoid	1.29±0.15	0.34±0.15	0.11±0.02	-	B
25	1183	3,7-dimethyl-1,5-octadien-3,7-diol	0.69±0.10	0.52±0.23	0.26±0.02	0.19±0.04	C
26	1188	α-terpineol	2.35±0.20	1.43±0.59	1.32±0.32	0.78±0.19	A
28	1217	nerol	0.74±0.08	0.40±0.17	0.44±0.13	0.28±0.04	A
29	1244	geraniol	2.49±0.18	1.34±0.50	1.21±0.31	0.68±0.18	A
32	1310	theaspiraneA	0.18±0.01	0.09±0.03	0.08±0.02	0.07±0.01	A
38	1545	elemol	0.19±0.02	0.10±0.06	0.12±0.01	0.09±0.04	B
39	1557	nerolidol	0.90±0.11	0.39±0.15	0.35±0.07	0.18±0.07	A
40	1654	T-muurolol	0.52±0.10	0.29±0.15	0.49±0.02	0.40±0.18	B
<b>Carbonyls</b>							
3	830	furfural	0.84±0.00	0.41±0.19	0.42±0.12	0.45±0.09	A
4	851	(E)-2-hexenal	1.13±0.10	0.56±0.29	0.54±0.11	0.39±0.05	A
8	901	heptanal	0.11±0.01	-	-	-	B
9	906	methional	0.33±0.07	0.17±0.05	0.14±0.04	0.12±0.05	A
10	958	benzaldehyde	0.71±0.16	0.34±0.16	0.36±0.08	0.36±0.10	A
13	1040	phenylacetaldehyde	10.36±0.54	6.06±2.66	4.71±1.18	3.01±0.70	A
14	1061	1-phenylethanone	0.62±0.01	0.44±0.16	0.49±0.14	0.47±0.09	C
23	1149	2-phenylpropenal	0.42±0.06	0.04±0.02	0.03±0.01	-	C
34	1374	β-damascenone	0.12±0.02	0.07±0.03	0.04±0.01	0.03±0.00	B
35	1387	(Z)-jasmone	0.45±0.01	-	-	-	A

No.	RI <sup>a</sup>	Volatile compounds	Relative peak area (%) <sup>b</sup>				ID <sup>g</sup>
			C100 <sup>c</sup>	C60 <sup>d</sup>	C35 <sup>e</sup>	C10 <sup>f</sup>	
<b>N-Containing Compounds</b>							
5	856	N,N-diethyl-butanamine	-	-	-	0.27±0.21	C
21	1133	benzeneacetonitrile	1.11±0.03	0.35±0.18	0.36±0.11	0.21±0.07	C
30	1287	1H-indole	2.13±0.11	0.52±0.11	0.25±0.09	0.12±0.05	A
41	1833	caffeine	0.20±0.02	0.09±0.04	-	-	B
<b>Miscellaneous</b>							
6	875	isoamyl acetate	0.60±0.12	0.37±0.17	0.41±0.09	0.51±0.12	B
7	886	4-methoxybutanoic acid	-	-	-	0.35±0.10	C
33	1328	3-methyl-5-propyl-nona ne	0.12±0.02	-	-	0.08±0.02	B
36	1470	1,2-dimethyl-cyclooctane	1.08±0.33	1.25±0.45	1.57±0.41	1.30±0.26	B

<sup>a</sup> Relative indices were determined using n-paraffins C<sub>7</sub>-C<sub>22</sub> as external references.

<sup>b</sup> Relative peak areas compared to that of internal standard (0.3 mL of 500 ppm geranyl acetone).

<sup>c</sup> 0% caffeine removed.

<sup>d</sup> 38.58% caffeine removed.

<sup>e</sup> 64.77% caffeine removed.

<sup>f</sup> 87.41% caffeine removed.

<sup>g</sup> Identification : A, mass spectrum and retention index were consistent with those of an authentic standard; B, mass spectrum was identical with that of Wiley 275 mass spectrum database and retention index were consistent with those of the literatures (Kondjoyan and Berdague, 1996; Acree, 1997). C, mass spectrum was consistent with that of Wiley 275 mass spectrum database.

<sup>h</sup> Not detected.

#### 나. 탈카페인 정도에 따른 녹차엽의 향기활성성분 비교

Control(C100) 녹차와 탈카페인 녹차의 향기활성성분은 향추출물 회석법(AEDA)에 의해 GC-O를 수행하였다. 전체 26개의 향기활성성분이 동정되었으며, 그 중 20개의 향미성분이 인지되었다. 꽃향을 나타내는 phenylacetaldehyde는 control 녹차와 탈카페인 녹차에서 모두 높은 FD factor를 나타내었으며, 구운 감자향이 나는 화합물인 methional도 두 시료 모두 2번째로 높은 FD 값을 나타내었다. 이 화합물은 녹차를 roasting 하는 과정, SDE에 의해 추출하는 과정 등 가열에 의해 생성되는 화합물로 여겨졌다. 녹차의 향을 나타내는 대표적인 물질인 linalool, 과일 향을 나타내는 hotrienol과 같은 화합물은 control 시료에서 높게 인지되었다. Benzaldehyde는 강한 아몬드 향, β-damascenone은 달콤한 꽃 향을 나타내며 control 녹차시료에서만 동정되었다. 반면에 3-methyl-butanol(malty-like)은 탈카페인된 녹차에서만 인지되었다. Benzyl alcohol, benzaldehyde, hotrienol, nerol, 몇몇 미동정된 화합물은 탈카페인 녹차엽에서는 동정되지 않았으며, 이는 탈카페인되는 과정 중에 손실 된 것으로 사료되었다. 이전에 보고된 녹차의 향에 관여하는 (E)-hexanol과 그 ester 등은 녹차 엽의 freshness와 관련 있으며, 본 실험에서 동정된 유도체인 (E)-2-hexenal은 녹차의 green odor에 관여하였다. 또, 풀을 베었을 때 나는 향인 hexanal은 control 녹차시료에서만 동정되었다. 기존 연구에서 덩어리 차에서 roasting 하는데 생성되는 것으로 알려진 pyrazine류 및 pyrrole류 중에서 roasty 하고 nutty한 향을 나타내는 2,6-dimethyl-3-ethylpyrazine과 2,3-diethyl-5-methylpyrazine은 control 녹차 시료에서만 동정되

었다. Fatty한 향을 내는 미동정 화합물은 탈카페인 녹차에서만 나타났으며 높은 FD factor를 가졌다. 이 밖에도 몇 개의 미동정된 화합물이 있으며, 카페인 제거에 의해 휘발성 향미성분이 줄어드는 경향처럼 주요한 향기활성성분도 감소하였다.

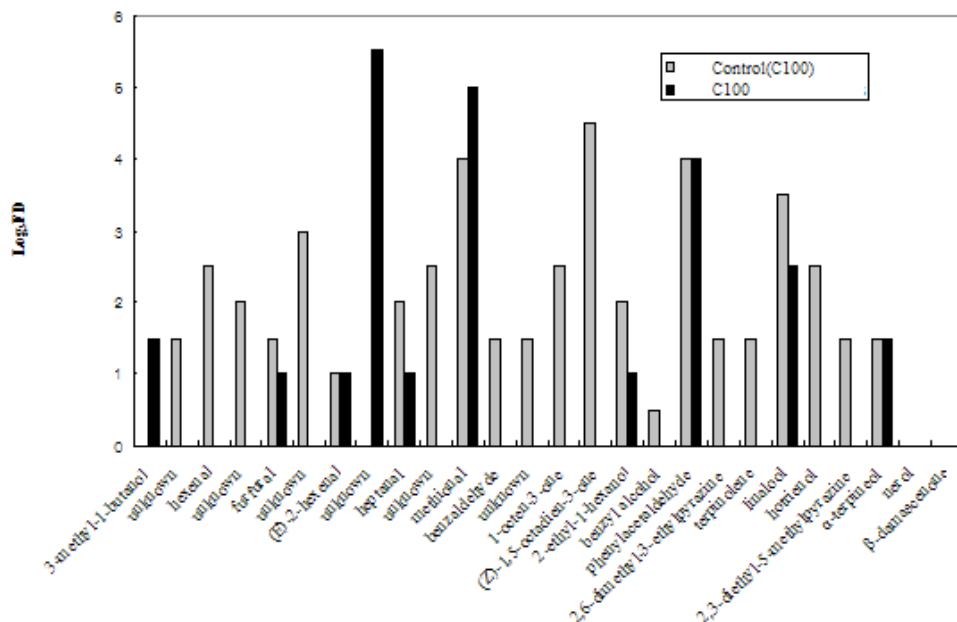


Fig. 9.2. Flavor dilution (FD) chromatogram obtained by AEDA in control(C100) and C10 green tea.

Table 9.2. Aroma-active compounds in control(C100) and C10 green tea

No.	RI <sup>a</sup>	Possible compounds	Aroma descriptions <sup>b</sup>	Log <sub>3</sub> FD <sup>c</sup>		ID <sup>d</sup>
				C100	C10	
1	735	3-methyl-1-butanol	malty	- <sup>e</sup>	1.5	A
2	745	unknown	green	1.5	-	
3	789	hexanal	green, cut-grass	2.5	-	B
4	804	unknown	floral	2	-	
5	815	furfural	almond-like, sweet	1.5	1	A
6	824	unknown	chemical, green	3	-	
7	842	( <i>E</i> )-2-hexenal	green	1	1	A
8	867	unknown	fatty	-	5.5	
9	904	heptanal	fatty, pungent	2	1	A
10	912	unknown	green, roasted	2.5	-	
11	925	methional	potato-like	4	5	A
12	963	benzaldehyde	almond-like	1.5	-	A
13	974	unknown	medicinal	1.5	-	
14	981	1-octen-3-one	mushroom-like, metallic	2.5	-	B
15	986	( <i>Z</i> )-1,5-octadien-3-one	hay-like	4.5	-	B
16	1030	2-ethyl-1-hexanol	rose-like, sweet	2	1	A
17	1039	benzyl alcohol	floral, sweet	0.5	-	A

18	1051	phenylacetaldehyde	green, hyacinth-like	4	4	A
19	1085	2,6-dimethyl-3-ethylpyrazine	roasted	1.5	-	B
20	1088	terpinolene	pine-like	1.5	-	A
21	1106	linalool	floral	3.5	2.5	A
22	1110	hotrienol	pungent, citrus	2.5	-	A
23	1158	2,3-diethyl-5-methylpyrazine	nutty, meaty	1.5	-	B
24	1194	$\alpha$ -terpineol	sweet	1.5	1.5	A
25	1210	nerol	fresh, sweet	0	-	A
26	1405	$\beta$ -damascenone	honey-like, sweet	0	-	A

a Retention index determined using n-paraffins C<sub>7</sub>-C<sub>22</sub> as references.

b Aroma description assigned during AEDA.

c Log<sub>3</sub> (flavor dilution factor).

d Identification; A, retention index, mass spectrum, and aroma property; B, retention index and aroma property.

d Not detected.

## 제 10 절 Ethyl acetate에 의해 탈카페인된 녹차엽의 휘발성 향미 성분 분석 및 향기활성성분 분석

### 1. Ethyl acetate에 의한 탈카페인된 녹차엽과 regular한 녹차엽과의 휘발성 향미성분 및 향기활성성분 분석을 위한 실험조건

#### 가. 녹차 엽의 시료조건

Ethyl acetate를 이용한 카페인 제거 시 분쇄된 녹차엽 사용이 효율을 높여줌에 따라 비교 대상이 될 control 시료 역시 탈카페인 시료와 같은 조건으로 처리 후 녹차에 에틸아세테이트랑 95% 에탄올을 섞어서 추출한 것을 진공오븐으로 건조 시켰다.

#### 나. 녹차엽의 휘발성 향미성분 추출

Regular 시료(카페인 제거되지 않은 녹차)와 탈카페인된 녹차시료를 각각 50g씩 70 °C 증류수 500 mL에 3분 동안 우려낸 후 면포 (다시백, T&C electronics, 의왕시, 경기도, 한국)를 이용하여 걸러냈다. 녹차엽의 휘발성 향미성분 분석을 위해 1, 2차년도에서 결정된 동시재증류장치법을 이용하여 2시간동안 추출하였다. 한편, 내부표준물질로 0.1mL isoeugenol [500 ppm (v/v) in dichloromethane]을 사용하였다. 추출이 끝나면 sodium sulfate로 수분을 제거하고, final volume 0.1mL까지 질소 농축한 후 1 $\mu$ L를 GC-MS에 주입하였다.

#### 다. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

SDE를 사용하여 추출한 녹차엽의 휘발성 향미성분은 GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)에 의하여 분석되었다. GC-MS는 HP 5890A series II GC/HP 5972 mass selective detector(Hewlett-packard Co., USA), FID(Flame Ionized Detector)로 수행하였으며, column은

DB-5ms(30 m length x 0.25 mm i.d. x 0.25  $\mu$ m film thickness, J&W scientific, Folsom, CA, USA)를 사용하였다. Oven의 온도는 40°C에서 3분간 유지시킨 후, 분당 4°C씩 올려 250°C에서 5분간 유지시켰다. Injector와 detector의 온도는 각각 200°C, 250°C 이며, 나머지 mass selective detector의 조건은 ionization energy, 70eV ; mass range, 33-550 a.m.u.; scanning rate, 1.4 scans/s와 같았다. 이동상 기체는 helium으로 유속은 0.8 mL/min을 유지하고, splitless mode를 사용하였다.

#### 라. 녹차엽의 향미성분 분석

녹차 엽의 휘발성향미성분은 GC-MS에 의해 동정 및 정량 하였다. GC-MS에 의해 분석된 녹차 엽의 휘발성 향미성분은 RI(Retention index)값과 GC-MS의 Wiley library 275.I 및 mass spectrum data를 근거로 동정하였고, authentic compounds를 사용하여 확인하였다. 정량은 내부표준물질(0.1 mL of 500 ppm isoeugenol)의 peak area에 대한 동정 화합물의 peak area의 percentage로 계산하여 나타내었다.

#### 마. 녹차 엽의 향기활성성분 분석

녹차 엽의 향미성분 분석과 동일한 조건으로 동시재증류추출법 (SDE)을 이용하여 2시간 동안 추출한 후 sodium sulfate로 수분을 제거하고, final volume 0.1 mL까지 질소 농축하였음. 농축된 시료는 dichloromethane을 사용하여 1:3의 희석배수로 희석하면서 GC-O를 수행하였다.

탈카페인 녹차엽의 향기활성성분 분석에 사용된 GC-O는 GC(Varian CP-3800 GC, Walnut Creek, USA)에 flame ionization detector(FID)와 sniffing port (ODO II, SGE Ringweed, Australia)를 설치한 것이었다. GC column의 끝은 FID와 sniffing port 사이에서 1:1로 분지하였으며 이때는 deactivated capillary column (0.5 m length x 0.25 mm i.d.)을 사용하였다. GC oven 온도는 40°C에서 3분 유지한 후 250°C까지 분당 4°C씩 상승시켜 5분 동안 유지하였음. 나머지 실험 조건은 GC/MS의 것과 동일하게 하였다.

## 2. Ethyl acetate에 의한 탈카페인된 녹차엽과 regular한 녹차엽과의 휘발성 향미성분 및 향기활성성분 비교분석

### 가. Ethylacetate에 의해 탈카페인 녹차엽과 regular한 녹차엽의 휘발성 향미성분 비교

Regular 녹차엽과 탈카페인된 녹차엽의 휘발성 향미성분을 분석한 결과, 총 40개의 성분들이 동정되었으며, 8개의 alcohols, 5개의 terpenes과 oxygenated terpene계 화합물, 15개의 carbonyls, 3개의 질소함유 화합물, 2개의 aliphatic hydrocarbons 6개의 기타 화합물이 정량되었다. 일반적으로 녹차의 향미성분 분석 시 다양한 alcohols 및 aldehydes성분들이 동정됨. 특히, linalool이나 geraniol과 같은 terpene계 성분들은 녹차의 휘발성 향미성분에서 주요 성분으로 확인되었다. 동정된 8개의 aldehydes 중에서는 2,4-heptanal가 다량으로 정량 ( $5.31\pm 0.56$ ) 되었다. 이 성분들은 구수



한향을 나타내며 녹차의 향기성분 중에 좋은 향을 나타내는데 영향을 주는 물질이었다. 고소한 향에 기여하는 것으로 보이는 기존 논문에서 알려진 pyrazine 및 pyrrole류는 아미노산과 당에 의한 Maillard 반응에 의해 생성되는 물질로 녹차엽을 roasting하는 과정 중에 생성되는 물질로 여겨진다. 그리고 향긋한 향에 기여하는 물질로는 linalool L 그리고 cis-geraniol이 있다. 디카페인 과정에서 이런 화합물들의 감소하는 것을 볼 수 있었다. 본 실험 결과, 녹차엽의 휘발성 향미성분은 카페인을 제거하는 과정에서 손실되었다. Linalool의 경우 카페인 제거된 시료( $1.08 \pm 0.30$ )는 control 녹차 시료( $6.9 \pm 0.68$ )에 비해 크게 감소하였음. 또, (*E*)-2-hexenal이나 heptanal처럼 상대적으로 분자량이 작은 물질도 카페인이 제거됨에 따라 크게 감소하였다. 따라서 많은 휘발성 향미성분들이 카페인을 제거하는 동안 카페인과 함께 추출되어 나왔을 가능성이 있었다. Cis-2-pentenol, phenol, 2-methyl-4-vinyl, phellandrene, octanal, ethanone, alpha,-cadinal, Furan 과 같은 성분들은 control 녹차시료에서만 동정되었으며, 4-Ketoisophorone, cyclobuten, benzeneacetaldehyde, 2-methyl-1-butanol 은 ethyl녹차시료에서 동정되었다. 유기용매가 휘발될 때 휘발성 향미성분도 함께 손실되는 것으로 보였다.

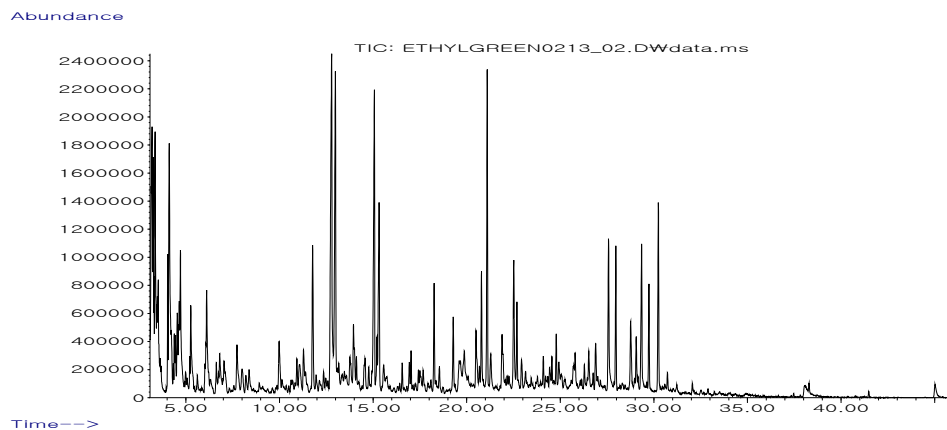
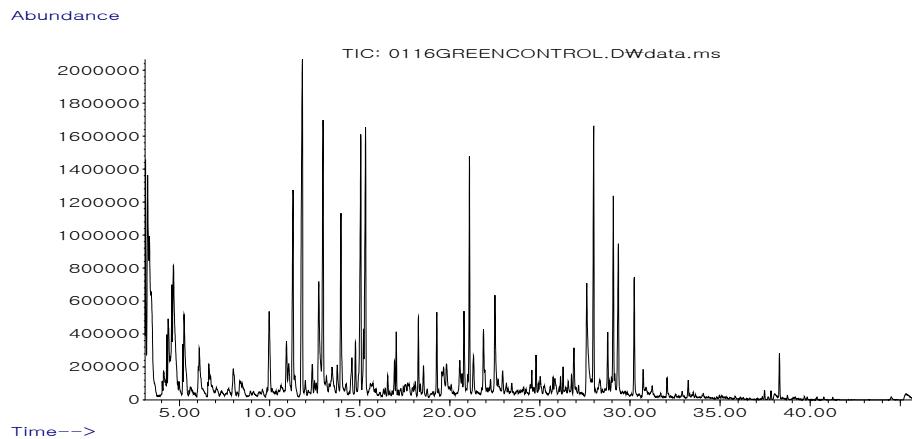


Fig. 10.1. GC-MS total ion chromatograms of volatile compounds isolated from regular green tea (upper) and decaffeinated green tea (lower) using ethylacetate by SDE

Table 10.1. Contents of volatile components in regular and decaffeinated green teas

No	RI <sup>a</sup>	Volatile components	Relative peak area (%) <sup>b</sup>	
			Regular <sup>c</sup>	Decaffeinated green tea
<b>Alcohols</b>				
1	705	1-pentene-3-ol	5.85±0.86	3.03±1.49
2	742	1-butanol-2-methyl-	-	1.59±0.53
3	768	cis 2 pentenol	1.82±0.58	-
4	774	2-penten-1-ol	6.21±0.85	0.82±0.40
5	1037	benzenemethanol	4.24±0.63	6.20±3.37
6	1314	2-methyl-4-vinyl- phenol	2.56±0.30	-
7	1513	2,6-bis- phenol	1.08±0.04	2.13±1.15
8	2068	phytol	0.72±0.03	-
<b>Terpenes and Oxygenated terpenes</b>				
9	1088	Linalool oxide cis	1.16±0.05	-
10	1101	Linalool L	6.9±0.68	1.08±0.30
11	1143	2,6,6-trimethyl-2-cyclohexene	0.40±0.01	-
12	1190	α-terpineol	1.55±0.11	1.92±0.63
13	1257	cis-geraniol	1.28±0.23	1.33±0.40
<b>carbonyls</b>				
14	758	2-pentenal	1.40±0.58	0.86±0.28
15	820	furfural	-	2.56±0.99
16	801	hexanal	0.50±0.07	0.37±0.16
17	804	2-hexanal	0.66±0.22	0.55±0.16
18	901	4-heptanal	0.94±0.11	1.32±0.45
19	959	benzaldehyde	1.58±0.98	1.86±0.36
20	1012	2,4-heptanal	5.31±0.56	1.32±0.45
21	1038	phellandrene	0.74±0.09	-
22	1143	benzeneacetaldehyde	-	7.27±2.87
23	1058	octanal	1.46±0.13	-
24	1066	ethanone	0.48±0.18	-
25	1071	3,5octadien2-one	4.13±0.36	1.42±0.41
26	1385	2-buten-1-one	0.69±0.08	0.88±0.32
27	1436	alpha-Ionone	0.32±0.07	2.56±0.82
28	1760	α-cadinol	0.18±0.09	-
<b>N-Containing Compounds</b>				
29	1851	cafein	0.22±0.03	-
30	1235	benzeneacetonitrile	0.74±0.06	7.27±2.87
31	1480	dihydroactinidiolide	3.34±0.44	-
<b>Furan</b>				
32	991	Furan	1.07±0.20	-
<b>Miscellaneous</b>				
33	1227	pyridine,2-methyl-4-viny	0.73±0.38	-
34	1523	myristicin	3.47±0.27	-
35	1480	dihydroactinidiolide	3.34±0.44	-
36	1143	4-Ketoisophorone	-	0.44±0.09

37	1579	beta-magastigmairienme	0.57±0.14	-
38	1033	cyclopentene		4.30±1.43
Relative peak area (%) <sup>b</sup>				
No	RI <sup>a</sup>	Volatile components	Regular <sup>c</sup>	Decaffeinated green tea
<b>Aliphatic hydrocarbons</b>				
40	1319	Nonane,2,2,4,4,6,8,8-heptamethyl-	-	1.88±0.80
41	1473	cyclododecane,1-dodecanol,n-dodecanol	3.02±1.67	3.96±0.81

<sup>a</sup> Relative indices were determined using n-paraffins C<sub>7</sub>-C<sub>22</sub> as external references.

<sup>b</sup> Relative peak areas compared to that of internal standard (0.1 mL of 500 ppm isoegenol).

나. Ethylacetate에 의해 탈카페인 녹차엽과 regular한 녹차엽의 향기활성성분 비교

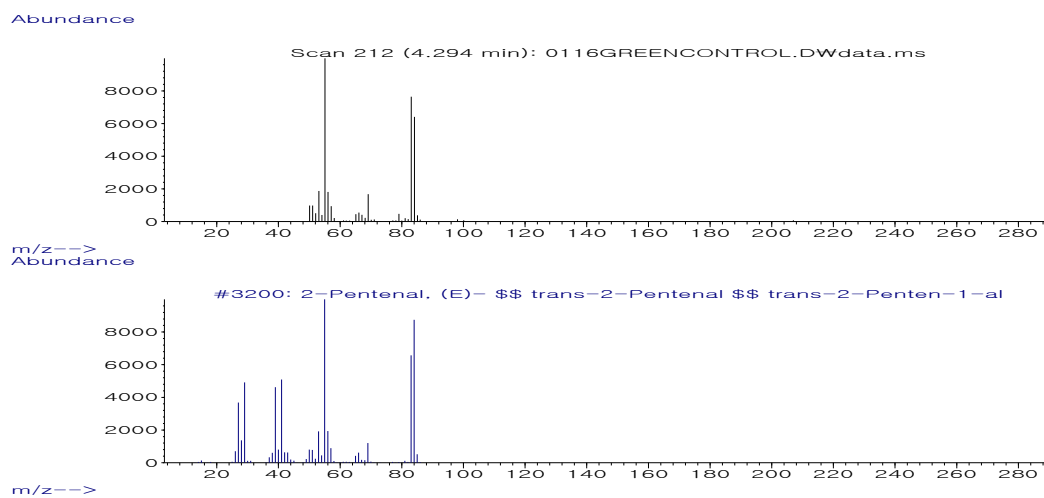
Regular 녹차와 탈카페인 녹차의 향기활성성분은 향추출물 회석법 (AEDA)에 의해 GC-O를 수행하였다. 전체 14개의 향기활성성분이 동정되었으며 (Table 10.2), 그 중 12개의 향미성분이 인지되었다. Fig. 10.2는 정성된 향기활성성분의 GC-MS의 spectra를 나타낸 것이다. 고소한 향을 나타내는 4-heptanal은 control녹차와 탈카페인 녹차에서 모두 높은 FD factor를 나타내었으며, 삶은 밤향을 나타내었던 benzaldehyde도 높은FD 값을 가지는 것으로 분석되었다. 이 화합물은 녹차를 roasting 하는 과정, SDE에 의해 추출하는 과정 등 가열에 의해 생성되는 화합물로 여겨진다. 녹차의 향을 나타내는 대표적인 물질인 linalool, 꽃향을 나타내는 cis-geraniol 같은 화합물은 regular 시료에서 높게 인지되었다. 전체적인 향이 regular 시료 보다 약한 것으로 미루어 볼 때 탈 카페인화 시키는 과정에서 손실이 되었다고 사료되었다. 이전에 보고된 녹차의 향에 관여하는 (E)-hexanol과 그 ester 등은 녹차엽의 freshness와 관련 있으며, 본 실험에서 동정된 유도체인 (E)-2-hexenal은 녹차의 green odor에 관여함. 또, 풀을 베었을 때 나는 향인 hexanal은 control 녹차시료에서만 동정되었다.

Table 10.2. Aroma-active compounds in regular and decaffeinated green tea III

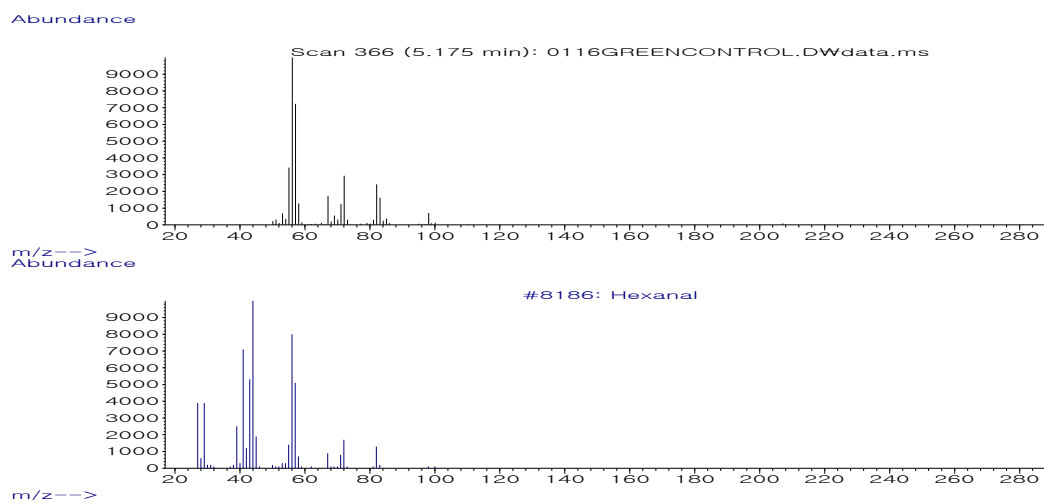
No.	Compounds	RI <sup>a</sup>	descriptions	Log <sub>2</sub> FD factor <sup>b</sup>		ID <sup>c</sup>
				Regular	Decaffeinated green tea III	
A	2-pentenal	785	tomato	7	7	B
B	hexanal	804	cut glass	7	4	A
4	2-hexanal	840	fatty up	4	4	A
C	4-heptanal	868	biscuit	13	10	A
D	unknown	915	chemical	11	9	A
9	benzaldehyde	934	almond	8	8	A
E	octanal	1064	soapy	5	3	B
F	unknown	1094	medicinal	5	5	A
G	linalool L	1102	lemon	8	2	A
H	alpha-terpineol	1125	gasiline	7	2	A
13	cis-geraniol	1235	rose	4	1	A
I	1H-indole	1354	mothball	4	2	B
J	myristicin	1523	spicy	4	2	A

a Retention index determined using n-paraffins C<sub>7</sub>-C<sub>22</sub> as references.  
b Aroma description assigned during AEDA.  
c Log3 (flavor dilution factor).  
d Identification; A, retention index, mass spectrum, and aroma property; B, retention index and aroma property.

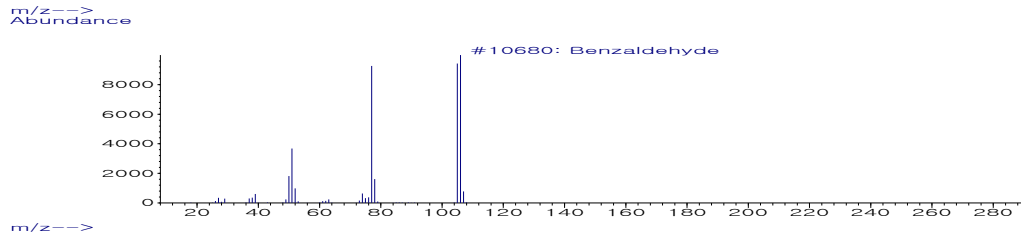
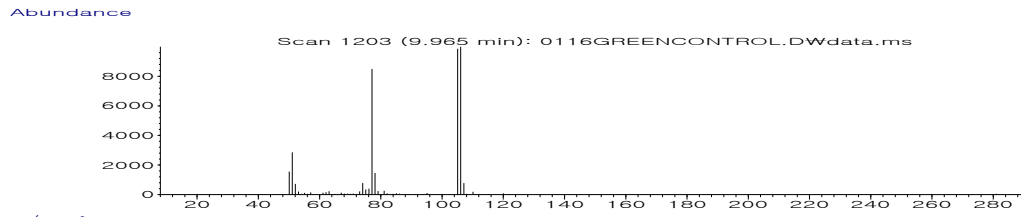
### 2-pentenal



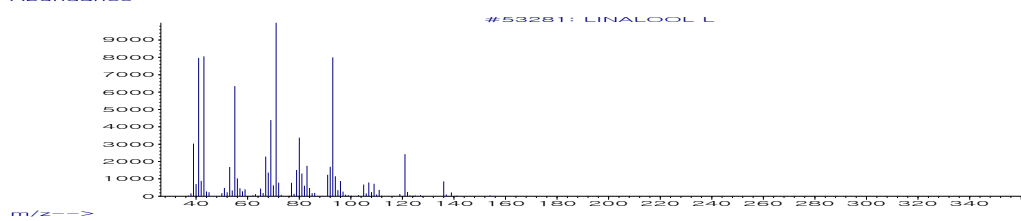
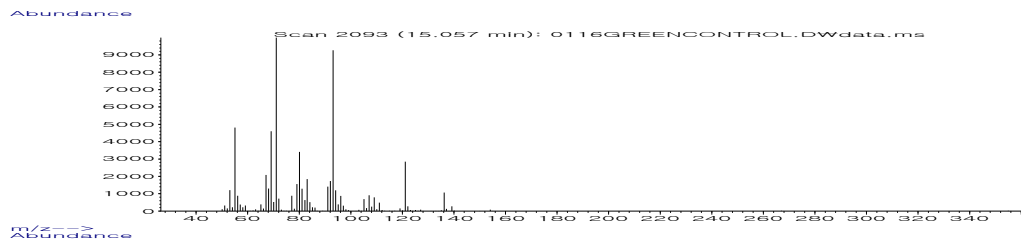
### hexanal



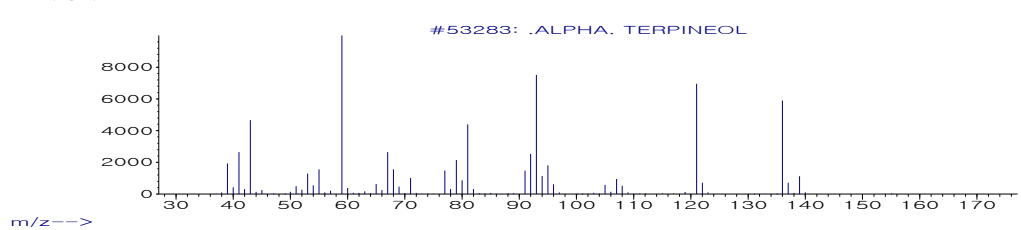
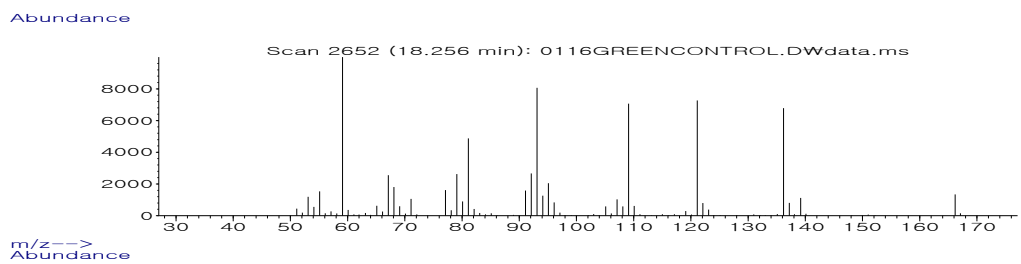
### benzaldehyde



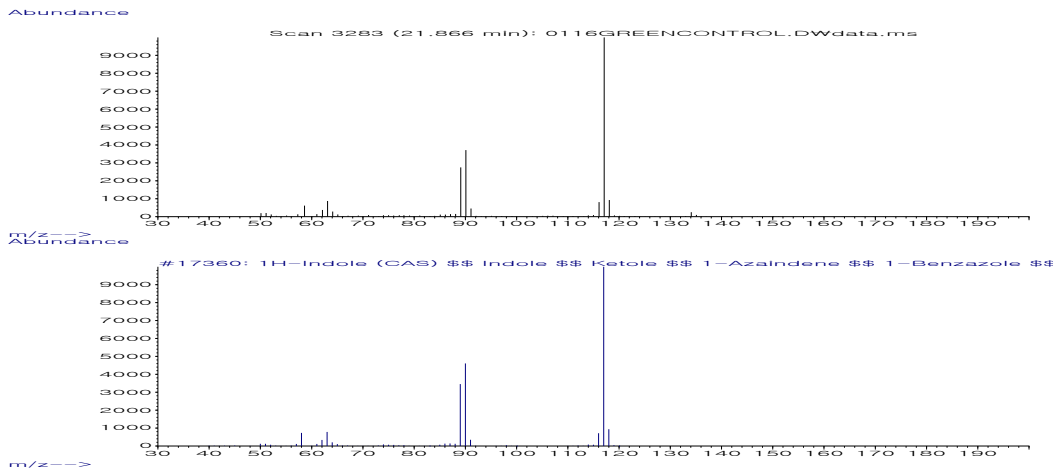
linalool L



$\alpha$ -terpineol



## 1H-indole



## phytol

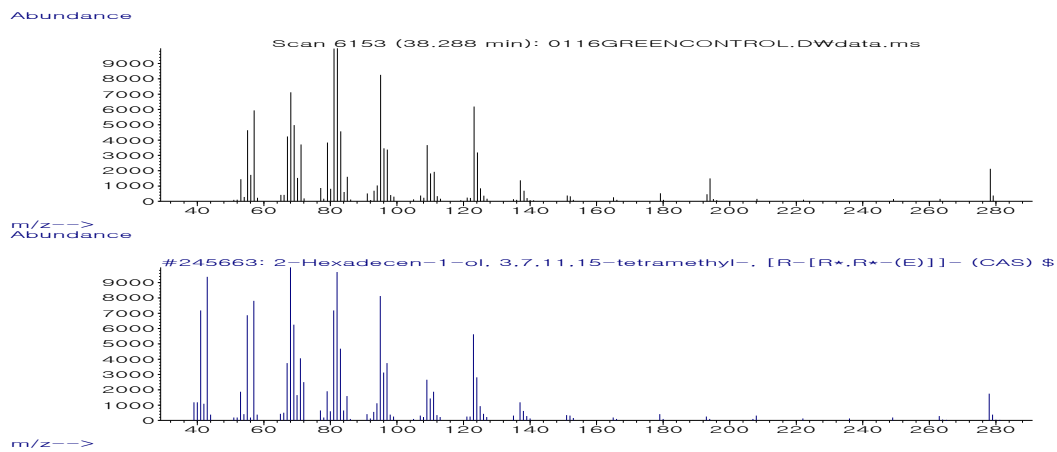


Figure 10.2. Mass spectra of aroma-active compounds identified in green teas

## 제 11 절 초임계 이산화탄소에 의해 탈카페인된 녹차엽의 관능검사

### 1. 패널 선정 및 훈련

녹차에 대한 묘사분석 패널 요원은 묘사분석에 경험이 있고, 관능검사에 관심과 참여 의지가 있는 이화여자대학교 식품영양학과 대학원생 8명(연령 22-35)으로 구성하였음. 훈련은 1주일에 4일 씩 1달간 이루어졌으며, 매회 훈련에 소요된 시간은 평균 1시간이었음. 훈련 과정에서는 평가원들

에게 다양한 녹차를 제시하여 외관, 향미, 감각에 대한 묘사용어를 개발하게 하였음. 즉, 패널요원 들은 녹차와 관련된 일련의 묘사용어를 나열하는 과정을 반복한 후, 이 용어에 대한 정의를 내렸 으며, 이에 따라 필요한 표준물질을 결정하였음. 또한 토의 과정을 통하여 모든 패널 요원이 동의 하는 평가방법 및 평가 순서를 결정하였음. 서로 간에 일치된 결과를 보일 때까지 패널 요원들을 훈련하였으며, 일치하지 못하는 패널은 추가적으로 훈련을 하였음. 훈련은 검사원이 시료와 평가 방법에 익숙해지고, 특성 강도 평가에 대하여 안정된 결과를 보일 때까지 진행하였음.

## 2. 시료 준비 및 제시

초임계 이산화탄소 추출시 처리 효율을 높이기 위하여 사용된 co-solvent인 ethanol이 완전히 제거되지 않음을 고려하여, 각 탈카페인 수준별로 100g의 녹차엽당 50℃에서 3시간동안 진공 oven(Isotemp Model 280A, Fisher Scientific, NJ, USA)에 넣어 ethanol을 휘발시킨 후, 전체를 섞 어서 보관하였다.

관능검사를 위한 녹차를 제조하기 위하여, 13g의 녹차엽을 1L Erlenmeyer flask에 넣고 입구를 밀봉하였다. Waterbath(창신과학, 서울)에 5초간 넣어 데운 flask에 70℃의 물 1L를 부운 후, 즉시 입구를 막고 우리는 동안 온도가 유지되도록 다시 waterbath에 넣고 녹차를 우림. 이 때, 우리는 시간은 1분과 2분이었다. 실험에 사용된 시료들은 카페인 잔존율(100%, 60%, 35%, 10%)과 녹차 를 우리는 시간(1분, 2분)에 따라 각각 나타내었다(Table 11.1). 우린 녹차는 폴리에틸렌과 폴리프 로릴렌 복합 섬유로 이루어진 직물(다시백, T&C electronics, 의왕, 경기도)을 통해 걸러졌다. 준비 된 녹차는 1L 보온병(One touch Apollo, Apollo corp., 양주, 경기도)에 담아 온도가 일정하게 유 지되도록 하였다. 평가 시작 전 검사용 보온병(200mL, IB-020TPY, Sejongisoli Corp., 대구)에 시 료를 125mL씩 담아 평가용 비이커(50mL)와 함께 각 검사원에게 제시하였으며, 평가 온도는 50± 2℃가 되도록 하였다.

시료의 제공 순서는 8×8 Williams Latin Square design(Williams, 1949)을 따랐으며 각 시료에 는 숫자에 대한 편견을 막기 위하여 난수표에서 선택한 세 자리 숫자를 표시하였다. 향미 특성을 평가하기 위한 시료는 칸막이가 되어 있는 개인 검사대에 한꺼번에 제시하였고, 평가하는 동안 입 을 행굴 수 있도록 정수기(Ceramic Filter System, Supercap, Dalton, Farley Industrial Ceramics Ltd., London, U.K.)를 통과시킨 45±2℃의 물을 함께 제시하였다.

Table 11.1 Decaffeinated green teas by SFE method used in the experiment

Sample identification	Level of caffeine (%)	Infusing time (min)
C100-1	100%	1
C100-2	100%	2
C60-1	60%	1
C60-2	60%	2

C35-1	35%	1
C35-2	35%	2
C10-1	10%	1
C10-2	10%	2

### 3. 평가 내용 및 절차

녹차의 묘사분석 시에는 정량적 묘사분석(quantitative descriptive analysis, QDA) 방법(Stone and Sidel, 1992)을 기본으로 하고 스펙트럼 묘사분석(spectrum descriptive analysis) 방법(Munoz and Civil, 1992)을 일부 적용하였다. 향미특성 평가를 위한 시료는 색의 차이에서 오는 편견을 배제시키기 위하여 개인 검사대의 어두운 적색 등 밑에 제시하였고, 외관 특성 평가를 위한 시료는 별도로 준비하고 새로운 번호를 붙여 light box(Superlight-III, Boteck, Siheong, Gyeonggido)의 day light(D65) 하에서 평가하도록 하였다. 외관 특성은 향미 특성의 평가가 먼저 이루어진 후에 평가하도록 하였다.

모든 시료들은 한꺼번에 제시되었으며, 둔화현상(adaptation effect)를 최소화하기 위하여, 패널 요원들은 처음 4개의 시료를 먼저 평가하고 10분간의 휴식 후 다음 4개의 시료를 평가하도록 하였다. 훈련과정을 통해 개발된 특성 용어는 외관 특성 2가지, 향미 특성 11가지이었으며, 각 특성에 대한 용어정의와 대표하는 표준물질은 각각 Table 11.2, 3에 나타내었다. 녹차의 관능적 특성 강도는 15점 항목척도를 사용하여 1점(약)에서 15점(강)으로 갈수록 강도가 강해지는 것을 나타내었고, 패널 요원에게는 각 특성에 대한 강도를 항목 척도 상에 표시하도록 하였다.

검사원이 시료를 평가하는 동안 온도를 유지하기 위해 관능검사원이 직접 시료가 담긴 개인별 보온병(200 mL, IB-020TPY, Sejongisoli Corp., 대구)에서 비이커(50mL)에 시료를 따라 맛보도록 하였다. 검사원이 녹차의 특성을 평가할 때에는 시료 10mL 정도를 입에 넣고 맛을 본 후 향미강도를 평가하도록 하였다. 각 세션은 약 30분이 소요되었으며, 4회 반복하여 평가되었다. 검사는 오전 11시와 오후 4시에 실시되었으며, 2일에 걸쳐 수행되었다. 실험에 참여하는 관능검사원들에게는 검사 1시간 전부터 물 이외의 음료나 음식물 섭취와 구강세척제 사용을 피하도록 하였고, 향이 진한 화장품의 사용을 금하도록 하였다.

### 4. 통계분석

녹차의 묘사분석 결과는 시료 간에 유의적으로 차이가 있는지를 알아보기 위하여 모든 관능적 특성 변수들의 중다공선성(multicollinearity)을 고려한 다변량 분산분석(multivariate analysis of variance, MANOVA)을 실행하였다. 그 결과 다변량 분산분석 모델이 유의적인 차이( $P < 0.001$ )를 보였으며, 따라서 각각의 관능적 특성들에 있어서 유의적인 차이가 있는지 알아보기 위하여 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 실시하였고, 그 결과에 따라 평균 간에 Duncan's multiple range test를 수행하였다( $P < 0.05$ ). 또한 시료들 간의 다양한 관능적 특성 차이를 요약하여 설명할 수 있도록 시료들의 관능적 특성별 평균값을 이용하여 주성분분석(principal component analysis,



PCA)을 수행하였다. 모든 통계분석은 SPSS for Windows 12.0(Spss Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 수행하였다.

Table 11.2 Definitions of the descriptive attributes of decaffeinated green teas by SFE method

Sensory Attributes	Definitions
Yellowness	Intensity of yellowness of green tea
Turbidity	Turbidity of green tea
Bitter taste	Fundamental taste sensation of which caffeine and quinine is typical
Astringency	The feeling which shrivels the tongue associated with tannins
Floral	Aromatics associated with flower such as jasmine
Grassy	Aromatics associated with cut grass
Fermented tea	Aromatics associated with fermented tea such as oolong tea and black tea
Roasted grain	Aromatics associated with roasted grain
Chestnut shell	Aromatics associated with chestnut shell
Dried straw	Aromatics associated with dried straw
Alcohol	Aromatics associated with roasted grain
Burnt leaf	Aromatics associated with burnt leaf
Metallic	Aromatics associated with metals, tinny, and iron

Table 11.3 Reference samples for the descriptive attributes of decaffeinated green teas by SFE method

Sensory Attributes	References samples
Yellowness	
Turbidity	
Bitter taste	0.1% Caffeine (Sigma-Aldrich, Inc., St.Louis, MO, USA) solution
Astringency	0.2% Tannic acid (Ducksan Pure Chemical Co. Ltd., Ansan, Gyeonggido) solution
Floral	10g Jasmine tea (1 tea bag [Chian Jasmine; Amorepacific Corp. Jinchun, Chungcheongbukdo] <sup>1)</sup> )
Grassy	10g cut grass
Fermented tea	10g Canned oolong tea (Dong Suh Oolong tea; Dong Suh Food

Co., Ltd., Jinchun, Chungcheongbukdo) mixed with 90g water

Roasted grain	25g Roasted-corn tea (2g Roasted corn [Roasted-corn tea; Dong suh Food Co., Ltd., Jinchun, Chungcheongbukdo] <sup>1)</sup> ) mixed with 45g green tea (1 tea bag [Shulloc Cha Jinhyang, Amorepacific Corp. Jinchun, Chungcheongbukdo] <sup>1)</sup> )
Chestnut shell	30g Chestnut Shell (from Gonju, Supermarket, Youngdongpo, Seoul) boiled with 500ml water at low heat for 10 min
Dried straw	10g Dried straw
Alcohol	7g Vodka (Smirnoff vodka red; Smirnoff, London) mixed with 100g green tea (1 tea bag [Shulloc Cha Jinhyang; Amorepacific Corp. Jinchun, Chungcheongbukdo] <sup>1)</sup> )
Burnt leaf	Burnt leaves
Metallic	Stainless Steel Spoon

<sup>1)</sup>Tea infused with 200ml boiling water for 2 min

## 5. 초임계 이산화탄소에 의해 탈카페인된 녹차엽의 관능검사 실험 결과

카페인 함량과 우리는 시간을 달리하여 제조한 8종의 녹차에 대하여 13가지의 관능적 특성을 평가하였으며, 다변량 분산분석을 수행한 결과 시료 간에 전체적으로 유의적인 차이가 나타났다 ( $P < 0.001$ ). 또한 각각의 관능적 특성에 있어서 시료 간에 유의적인 차이가 있는지 알아보기 위하여 분산분석(ANOVA)을 수행하였으며, 그 결과에 따라 Duncan's multiple range test를 수행하였다. 그 결과, 모든 특성들은 시료에 대하여 유의적인 차이를 나타내었다 ( $P < 0.05$ ). 또한 카페인 함량과 우리는 시간, 두 요인이 관능적 특성들에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 분산분석을 실시하여 F값을 알아본 결과(Table 11.4) 카페인 함량에 따른 요인은 모든 관능적 특성들에 대하여 유의성을 보였으며, 우리는 시간에 대해서는 외관 특성, 쓴맛, 마른 잎 탄 향미 특성에서 유의성을 나타내는 것으로 나타났다. 두 요인의 교호작용에 의해서는 색의 진한 정도 특성만 유의적으로 영향을 받은 것을 볼 수 있다. 모든 관능적 특성에 대하여 카페인 함량에 따른 요인이 우리는 시간에 따른 요인보다 더 큰 F값을 보였기 때문에 탈카페인 녹차에 대하여 더 큰 효과를 보였음을 알 수 있었다. 주성분 분석을 실시한 결과 제 1주성분(PC 1)과 제 2 주성분(PC 2)이 각각 총변동의 69%와 28%를 설명하여 총 변동의 97%를 설명하였음(Fig. 11.1).

각 특성들이 주성분에 대하여 부하된 양상을 보면, 색의 진한 정도, 탁한 정도, 쓴맛, 떫은 감각, 꽃 향미, 풀 향미, 볶은 곡류 구수한 향미, 마른 지푸라기 향미, 밤 껍질 향미 특성들이 PC 1에 대하여 양의 방향으로 높게 부하되어 있으며, 서로 인접해 위치한 것으로 보아 특성 간 강한 양의 상관관계가 있음을 알 수 있었다. 또한 알콜 향미 특성은 PC 1의 음의 방향으로 높게 부하되어 있는 모습을 보였다. PC 2에 대하여 특성들이 부하된 양상을 살펴보면, 쓴맛, 마른 잎 탄 향미, 발효된 차 향미, 알콜 향미, 금속성, 떫은 감각 특성이 양의 방향으로 높게 부하되어 있었다. 따라서 PC 1은 색의 진한 정도, 탁한 정도, 쓴맛, 떫은 감각, 꽃 향미, 풀 향미, 볶은 곡류 향미, 마른 지

푸라기 향미, 밤 껍질 향미(양의 방향)와 알콜 향미(음의 방향)를 설명하는 주성분이며, PC 2는 쓴맛, 마른 잎 탄 향미, 발효된 차 향미, 알콜 향미, 금속성, 뚱은 감각(양의 방향)을 설명하는 주성분이라 할 수 있다(Fig. 11.1, Table 11.5).

시료들이 주성분에 의해 부하된 정도를 보면, 탈카페인 공정을 거치지 않은 시료 C100-1과 C100-2는 PC 1에 대해 양의 방향으로 부하되어 있었으며, 나머지 탈카페인 공정을 거친 시료들은 음의 방향으로 부하되었다. PC 2에 대하여 탈카페인 처리 과정을 거친 시료들이 부하되어 있는 양상을 보면, 시료 C35-1, C35-2, C60-1, C60-2는 양의 방향으로 부하되어 있었으며, 시료 C10-1과 C10-2는 음의 방향으로 높게 부하되어 있는 것을 볼 수 있었다. 탈카페인 처리 공정을 거치지 않은 시료 C100-1과 C100-2는 PC 2 방향에 대해서는 크게 부하되지 않은 것으로 보아, PC 2에 의해서는 크게 설명되지 않음을 알 수 있다. 따라서 PC 1은 시료들을 주로 탈카페인 공정의 유무로 시료를 분류하는 주성분이라고 할 수 있으며, PC 2는 시료들을 주로 탈카페인 처리된 시료들을 처리 수준에 의해 분류하는 주성분이라고 할 수 있다.

시료 C100-1과 C100-2는 색의 진한 정도, 탁한 정도, 쓴맛, 뚱은 감각, 꽃 향미, 풀 향미, 붉은 곡류 구수한 향미, 마른 지푸라기 향미, 밤 껍질 향미 특성들과 같은 방향으로 근접하여 위치하고 있는 것으로 보아, 위와 같은 특성들이 탈카페인 공정을 거치지 않은 두 시료의 주요한 특성이라고 할 수 있다. 알콜 향미는 반대 방향으로 높게 부하되어 있는 것으로 보아 두 시료는 알콜 향미 특성이 약한 특징을 띠는 것을 알 수 있다. 또한 시료 C100-1과 C100-2 두 시료 간에는 쓴맛, 꽃 향미, 풀 향미 특성에 있어서 유의적인 차이가 나타났다(Table 11.5). 따라서 카페인 수준이 100%인 경우 색의 진한 정도, 탁한 정도, 쓴맛, 뚱은 감각, 꽃 향미, 풀 향미, 붉은 곡류 구수한 향미, 마른 지푸라기 향미, 밤 껍질 향미와 같은 특성들이 강한 것을 알 수 있으며, 우리는 시간이 증가함에 따라 쓴맛, 꽃 향미, 풀 향미 특성의 강도가 유의적으로 증가함을 알 수 있었다.

카페인 함량이 60%인 탈카페인 처리된 녹차시료 C60-1과 C60-2의 주요한 관능적 특성들은 뚱은 감각, 발효된 차 향미, 알콜 향미, 마른 잎 탄 향미, 금속성으로 나타났으며, 또한 Table 11.5을 통해 C60-1과 C60-2 두 시료 간에는 색의 진한 정도, 발효된 차 향미, 금속성의 특성에서 유의적인 차이를 보이는 것을 알 수 있다. 따라서 카페인 함량이 60%인 탈카페인 녹차의 경우 뚱은 감각, 발효된 차 향미, 알콜 향미, 마른 잎 탄 향미, 금속성의 특성들이 강한 것을 알 수 있으며, 색의 노란 정도, 발효된 차 향미, 금속성의 특성들은 우리는 시간이 길어짐에 따라 증가함이고 할 수 있다.

시료 C35-1과 C35-2는 뚱은 감각, 발효된 차 향미, 알콜 향미, 마른 잎 탄 향미 특성들과 유사한 방향으로 위치하여 높은 상관관계를 보이고 있으며, 따라서 이들 특성들은 35% 카페인을 함유한 탈카페인 녹차의 주요한 특성이라고 할 수 있다. 또한 35% 카페인을 함유한 녹차는 우리는 시간이 길어짐에 따라 탁한 정도의 특성이 증가된 것으로 보아(Table 11.5), 35% 카페인을 함유한 탈카페인 녹차의 경우 우리는 시간이 길어짐에 따라 탁한 정도의 특성에 영향을 받음을 알 수 있었다.

시료 C10-1과 C10-2는 알콜 향미를 제외한 모든 관능적 특성들이 약하게 나타났다. 카페인 함량이 10%인 탈카페인 녹차의 경우 대부분의 관능적 특성들이 약해졌음을 알 수 있었으며, 또한 두 시료 간에는 색의 진한 정도, 탁한 정도 특성이 유의적인 차이를 나타낸 것으로 보아(Table 11.5), 우리는 시간이 길어질수록 위의 두 특성의 강도가 증가하는 것을 알 수 있었다.

Table 11.4 F-values for the sensory attributes of decaffeinated green teas by SFE method

Sensory Attributes	Caffeine content	Infusing time	Caffeine content * Infusing time
Yellowness	216.27***	71.86***	6.55***
Turbidity	71.33***	11.18***	1.70
Bitter taste	73.42***	8.40**	2.57
Astringency	23.88***	2.11	0.06
Floral	185.10***	1.77	1.21
Grassy	187.49***	1.05	1.18
Fermented tea	31.84***	3.28	1.23
Roasted grain	166.35***	0.89	1.90
Chestnut shell	44.72***	3.60	1.06
Dried straw	39.18***	1.44	0.10
Alcohol	44.72***	0.12	0.10
Burnt leaf	18.33***	8.41**	0.35
Metallic	19.81***	0.66	2.31

\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

Table 11.5 Sensory characteristics<sup>1)</sup> of decaffeinated green teas<sup>2)</sup> by SFE method

Sensory attributes	C100-1	C60-1	C35-1	C10-1	C100-2	C60-2	C35-2	C10-2
Yellowness	6.72 <sup>a</sup>	3.56 <sup>d</sup>	3.28 <sup>d</sup>	3.25 <sup>d</sup>	7.06 <sup>a</sup>	4.02 <sup>c</sup>	4.69 <sup>b</sup>	4.47 <sup>b</sup>
Turbidity	5.88 <sup>a</sup>	4.00 <sup>bc</sup>	3.81 <sup>c</sup>	3.28 <sup>d</sup>	6.09 <sup>a</sup>	4.06 <sup>bc</sup>	4.47 <sup>b</sup>	4.00 <sup>bc</sup>
Bitter taste	7.31 <sup>b</sup>	7.12 <sup>b</sup>	7.12 <sup>b</sup>	4.84 <sup>c</sup>	8.44 <sup>a</sup>	7.53 <sup>b</sup>	7.16 <sup>b</sup>	5.03 <sup>c</sup>
Astringency	6.69 <sup>a</sup>	6.62 <sup>a</sup>	6.28 <sup>a</sup>	5.06 <sup>b</sup>	6.94 <sup>a</sup>	6.87 <sup>a</sup>	6.59 <sup>a</sup>	5.19 <sup>b</sup>
Floral	7.00 <sup>b</sup>	3.84 <sup>c</sup>	3.81 <sup>cd</sup>	3.22 <sup>e</sup>	7.56 <sup>a</sup>	3.72 <sup>cde</sup>	4.06 <sup>c</sup>	3.25 <sup>de</sup>
Grassy	6.87 <sup>b</sup>	4.16 <sup>c</sup>	3.97 <sup>c</sup>	3.06 <sup>d</sup>	7.41 <sup>a</sup>	4.06 <sup>c</sup>	4.09 <sup>c</sup>	3.03 <sup>d</sup>
Fermented tea	3.75 <sup>c</sup>	5.41 <sup>b</sup>	5.34 <sup>b</sup>	4.47 <sup>c</sup>	3.81 <sup>c</sup>	6.16 <sup>a</sup>	5.81 <sup>ab</sup>	4.41 <sup>c</sup>
Roasted grain	7.06 <sup>a</sup>	4.41 <sup>b</sup>	3.84 <sup>bc</sup>	3.16 <sup>d</sup>	7.25 <sup>a</sup>	4.03 <sup>b</sup>	4.34 <sup>b</sup>	3.34 <sup>cd</sup>
Chestnut shell	6.41 <sup>a</sup>	5.03 <sup>b</sup>	5.03 <sup>b</sup>	4.06 <sup>c</sup>	6.81 <sup>a</sup>	5.66 <sup>b</sup>	5.38 <sup>b</sup>	3.91 <sup>c</sup>

Dried straw	5.75 <sup>a</sup>	4.19 <sup>bc</sup>	4.13 <sup>bc</sup>	3.38 <sup>d</sup>	5.88 <sup>a</sup>	4.28 <sup>b</sup>	4.44 <sup>b</sup>	3.59 <sup>cd</sup>
Alcohol	2.34 <sup>b</sup>	5.13 <sup>a</sup>	5.06 <sup>a</sup>	4.34 <sup>a</sup>	2.25 <sup>b</sup>	5.19 <sup>a</sup>	5.16 <sup>a</sup>	4.56 <sup>a</sup>
Burnt leaf	4.13 <sup>cd</sup>	4.94 <sup>ab</sup>	4.81 <sup>b</sup>	3.69 <sup>d</sup>	4.72 <sup>bc</sup>	5.47 <sup>a</sup>	5.25 <sup>ab</sup>	3.87 <sup>d</sup>
Metallic	3.06 <sup>c</sup>	3.91 <sup>b</sup>	3.94 <sup>b</sup>	3.47 <sup>bc</sup>	2.94 <sup>c</sup>	4.56 <sup>a</sup>	3.97 <sup>b</sup>	3.31 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>Means within a row not sharing a superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ , Duncan's multiple range test).

<sup>2)</sup>See Table 3 for abbreviation

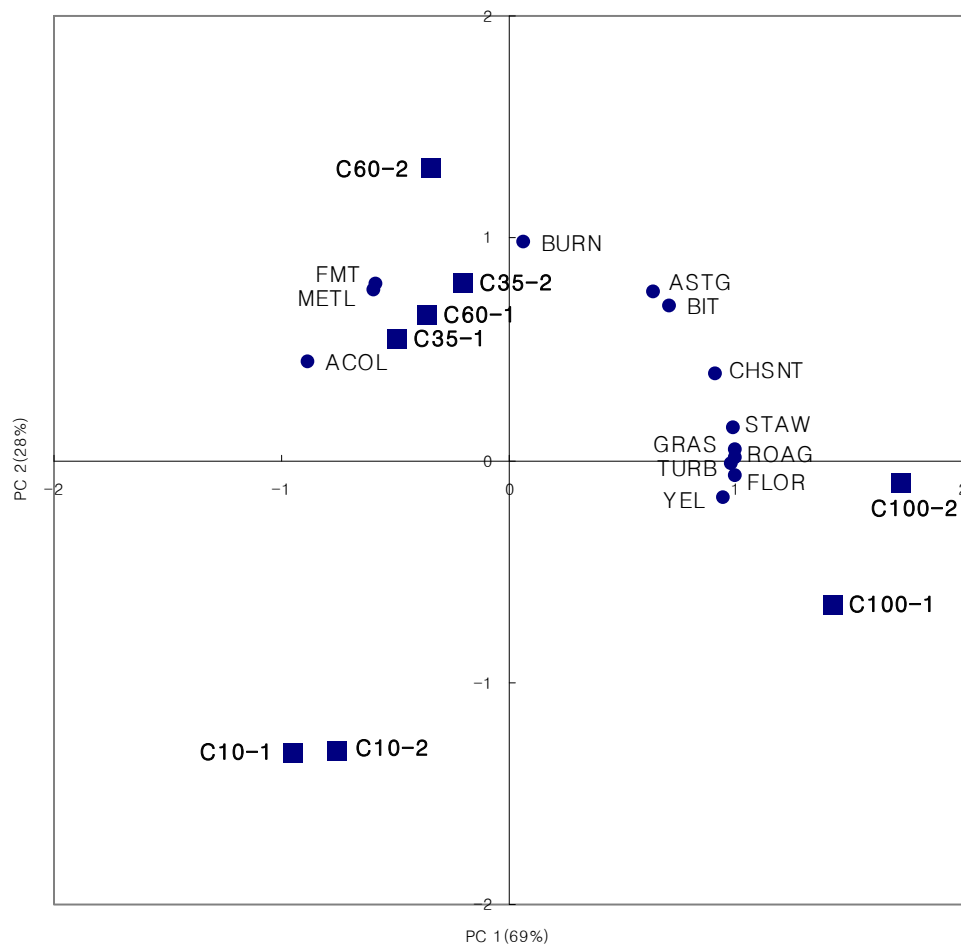


Figure 11.1 Principal component(PC) loadings and scores of the sensory attributes<sup>1)</sup> of decaffeinated green tea by SFE method for component 1 and 2

\*See Table 1 for abbreviation.

<sup>1)</sup>YEL, yellowness; TURB, turbidity; BIT, bitter taste; ASTG, astringency; FLOR, floral;

GRAS, grassy; FMT, fermented tea; ROAG, roasted grain; CHSNT, chestnut shell; STRW, dried straw; ACOL, alcohol; BURN, burnt leaf; METL, metallic.

## 제 12 절 초임계 이산화탄소에 의해 탈카페인된 녹차엽의 소비자 기호도 검사

### 1. 패널 선정

녹차에 대한 소비자 기호도 조사의 패널 요원은 두 그룹으로 나누어 모집하였다: 녹차 제품의 유형에 상관없이 일주일에 3회 이상 녹차를 즐겨 마시는 그룹(52명, 그룹 1), 뜨거운 잎녹차를 일주일에 3회 이상 우려마시는 그룹(42명 중 outlier 2명 제외 총 40명, 그룹 2). 총 92명의 소비자 패널은 모두 여대생으로서 이화여자대학교에서 모집하여 구성하였다.

### 2. 시료 준비 및 제시

시료의 준비과정은 묘사분석에서의 준비과정과 동일하게 진행되었다. 평가 시작 전 검사용 보온병(200mL, IB-020TPY, Sejongisoli Corp., 대구)에 시료를 125mL씩 나누어 평가용 유리잔과 함께 각 검사원에게 제시하였다. 평가 온도는 묘사분석에서와 동일하였다. 시료의 제공 순서는 randomized order를 따랐으며 각 시료에는 숫자에 대한 편견을 막기 위하여 난수표에서 선택한 세 자리 숫자를 표시하였다.

### 3. 평가 내용 및 절차

녹차에 대한 전반적인 기호도를 평가하기 위하여, 다시 맛보는 것을 허락하고 이전 시료에 대한 점수 수정을 허락하는 rank-rating(Kim & O'Mahony, 1998) 방법을 적용하였다. 척도는 15점 항목척도(bipolar)를 사용하였으며, 척도의 왼쪽 끝, 가운데, 오른쪽 끝에 순서대로 “대단히 많이 싫어한다”, “좋아하지도 싫어하지도 않는다”, “대단히 많이 좋아한다”라고 표시하였다.

실험은 1:1 인터뷰 형식으로 진행되었으며, 실험 시작 전에 시료 마시는 방법, 입을 행구는 방법, 척도(Rank-rating) 사용법에 대하여 설명하였다. 처음 시작하기 전과 시료 사이마다 제공된 정수기를 통과시킨 따뜻한 물( $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ )로 입을 행구도록 지시하였다. 검사원이 시료를 평가하는 동안 온도를 유지하기 위해 관능검사원이 직접 시료가 담긴 개인별 보온병(200mL, IB-020TPY, Sejongisoli Corp., 대구)에서 평가용 유리잔에 35mL씩 시료를 따라 맛보도록 하였으며, 기호도는 외관을 포함한 전반적인 기호도에 대하여 평가하도록 설명하였다. 검사는 오전 10시-오후 12시와 오후 3시-5시 사이에 실시되었다. 실험에 참여하는 소비자 패널요원들에게는 소정의 보상품을 제공하여 실험에 적극적으로 참여하도록 유도하였다.

#### 4. 통계분석

녹차의 소비자 검사 결과는 각각의 소비자 그룹의 기호도에 대하여 시료 간에 유의적으로 차이가 있는지를 알아보기 위하여 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 실시하였다. 그 결과에 따라 평균 간에 Duncan's multiple range test를 수행하였다( $P < 0.05$ ). 소비자의 전반적인 기호도와 녹차의 관능적 특성과의 관계를 파악하기 위하여 부분최소평방 회귀분석(Partial Least Square Regression, PLS-R)을 실시하였으며, 이 때 validation 방법은 Full cross-validation 방법을 사용하였다. 모든 통계분석은 SPSS for Windows 12.0(Spss Inc., Chicago, IL, USA) 및 Unscrambler (version 5.0, 1990, Camo As, Trondheim, Norway)를 사용하여 수행하였다.

#### 5. 초임계 이산화탄소에 의해 탈카페인된 녹차엽의 소비자 기호도 실험결과

카페인 함량 및 우리는 조건이 다른 총 8종의 녹차에 대한 소비자 그룹(그룹 1 52명, 그룹 2 40명)별 기호도는 각각 table 12.1과 table 12.2와 같이 나타났다. 녹차의 유형에 상관없이 녹차를 마시는 그룹 1의 경우, 탈카페인 수준이 가장 높은 C10-1과 C10-2 시료에 대한 기호도가 유의적으로 가장 높게 나타났다. 우리는 시간이 1분인 경우의 소비자 기호도의 경향은 C10-1 > C100-1, C60-1 > C35-1의 순서로 나타났으며, 우리는 시간이 2분인 경우의 소비자 기호도의 경향은 C10-2 > C100-2 > C35-2 > C60-2로 나타남(Table 12.1). 반면, 뜨거운 잎녹차를 즐겨 마시는 그룹 2의 경우, 탈카페인 공정을 거치지 않은 녹차 중 C100-1 시료에 대한 기호도가 유의적으로 가장 높았음. 우리는 시간이 1분인 경우의 소비자 기호도의 경향은 C100-1 > C10-1, C35-1, C60-1의 순서로 나타났으며, 우리는 시간이 2분인 경우의 소비자 기호도의 경향은 C10-2, C100-2 > C35-2, C60-2 순으로 나타남(Table 12.2).

Table 12.1 Consumer acceptability scores<sup>1)</sup> of group 1 for decaffeinated green teas<sup>2)</sup> by SFE method

C100-1	C60-1	C35-1	C10-1	C100-2	C60-2	C35-2	C10-2
6.81 <sup>bc</sup>	6.81 <sup>bc</sup>	6.27 <sup>c</sup>	8.50 <sup>a</sup>	6.38 <sup>c</sup>	5.06 <sup>d</sup>	6.02 <sup>cd</sup>	8.02 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup>Means within a row not sharing a superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ , Duncan's multiple range test).

<sup>2)</sup>See Table 1 for identification

Table 12.2 Consumer acceptability scores<sup>1)</sup> of group 2 for decaffeinated green teas<sup>2)</sup> by SFE method

C100-1	C60-1	C35-1	C10-1	C100-2	C60-2	C35-2	C10-2
9.54 <sup>a</sup>	7.18 <sup>b</sup>	7.00 <sup>b</sup>	7.77 <sup>b</sup>	7.97 <sup>ab</sup>	7.10 <sup>b</sup>	7.18 <sup>b</sup>	8.15 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup>Means within a row not sharing a superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ , Duncan's multiple range test).

<sup>2)</sup>See Table 1 for identification

## 6. 초임계 이산화탄소에 의해 탈카페인된 녹차엽의 소비자 기호도와 관능적 특성과의 관계

묘사분석 결과와 각 소비자 그룹(그룹 1 52명, 그룹 2 40명)의 기호도 결과에 대하여 부분최소 평방 회귀분석을 각각 실시한 결과는 Fig. 12.1와 12.2과 같이 나타났다. 그룹 1의 경우, 제 1주성분과 제 2주성분은 총변동에 대하여 각각 묘사분석 데이터의 69%와 29%를, 소비자 조사 데이터의 29%와 18%를 설명하였다. 그룹 2의 경우 제 1 주성분과 제 2주성분은 총변동에 대하여 각각 묘사분석 데이터의 69%와 28%를, 소비자 조사 데이터의 20%와 14%를 설명하였다. Figure 12.1a, 12.2a의 하나하나의 점들은 각각 개별 소비자를 나타내며, Figure 12.1b, 12.2b는 각각 8종의 녹차의 관능적 특성과 각 그룹의 소비자 기호도와의 관계를 보여준다. Fig. 12.3는 Table 11.4에서 F값이 크게 나타나 시료 사이를 분류해주는데 영향력이 큰 5가지의 주요한 관능적 특성(색의 진한 정도, 꽃향미, 풀향미, 볏은 곡류 향미, 쓴맛) 및 소비자 기호도의 평균이 탈카페인 수준에 따라 어떻게 변하는지 그 정도를 가지적으로 보여준다.

Fig. 12.1은 녹차의 유형에 상관없이 일주일에 3회 이상 녹차를 즐기는 소비자들의 기호도와 녹차의 관능적 특성과의 관계를 요약적으로 보여준다. 소비자의 기호도를 나타내는 각각의 점들은 제 1주성분과 제 2주성분의 양의 방향에 다수 위치하고 있음을 알 수 있는데, 이는 관능적 특성들 중 쓴맛의 위치와 반대방향임을 확인할 수 있다(Fig 12.1a). 대부분의 소비자들의 기호도는 녹차의 쓴맛 특성과 음의 상관관계의 경향을 띠다고 할 수 있으며, 따라서 비록 전반적으로 모든 녹차의 관능적 특성이 약하게 나타났지만 다른 시료에 비하여 상대적으로 쓴맛이 약하게 나타난 C10-1과 C10-2가 가장 선호된다(Table 12.1).

반면, 뜨거운 잎녹차를 즐겨 마시는 소비자들의 기호도와 녹차의 관능적 특성과의 관계를 살펴보면(Fig. 12.2), 대부분의 소비자들이 제 1주성분의 양의 방향에 위치하는 모습을 나타내고 있다. 제 1주성분의 양의 방향은 색의 진한정도, 탁한 정도, 꽃향미, 풀향미, 볏은 곡물 향미, 마른 지푸라기 향미의 특성들이 높게 부하되어 있는 것을 알 수 있다. 따라서 뜨거운 잎녹차를 마시는 소비자들의 경우에는 녹차의 다양한 향미 특성이 강하게 나타나는 녹차에 대하여 높은 기호도를 보이고 있는 것을 알 수 있었다.

탈카페인 수준에 따라 주요한 관능적 특성의 변화를 가지적으로 나타내는 Fig.12.3 을 살펴보면, 녹차의 주요한 관능적 특성들은 caffeine의 감소에 따라 대부분 감소하는 경향을 보였는데 이는 녹차 특유의 향미를 제공하는 것으로 알려져 있는catechin 물질들이 함께 제거에 기인하는 것으로 보인다. 카페인을 완전히 제거하지 않은 녹차(카페인 잔여수준 35%와 60%)의 경우, 다른 향미 성분의 감소가 크게 나타나 관능적으로 인지하는 쓴맛은 상대적으로 크게 감소하지 않는 것으로 나타난다. 또한 소비자의 기호도와 카페인 수준과의 관계를 살펴보면, 쓴맛이 가장 약한 C10-1과 C10-2의 기호도가 그룹 1에서는 가장 높게 나타났으며(Fig. 12.3a, 12.3b), 쓴맛은 상대적 높지만 주요한 향미성분의 강도가 가장 높게 나타난 C100-1은 다른 나머지 시료들에 비하여 상대적으로 선호되는 것을 알 수 있었다(Fig. 12.3a). 따라서 녹차의 기호도는 녹차의 주요한 향미성분과 쓴맛의 균형에 영향을 받고 있다고 생각해 볼 수 있다.

각 소비자 그룹의 기호도와 녹차의 관능적 특성과의 관계를 살펴보면, 그룹 1의 소비자들의 기



호도는 풀향미, 꽃향미, 볶은 곡류 향미 등 녹차의 다양한 특성이 풍부한 경우를 좋아하는 것으로 나타났으나 반면, 그룹 2의 경우 모든 관능적 특성의 강도가 약하더라도 쓴맛이 약한 녹차를 좋아하는 것으로 나타났다. 그룹 2의 사람들은 20대 여대생으로서 평소 녹차의 향미가 약한 티벳 녹차 또는 캔녹차를 주로 마시는 특징을 지니며, 따라서 그룹 1의 기호도는 최근 캔녹차, 티벳녹차 시장의 확대와 더불어 소비자들이 녹차의 약한 향미 강도에 익숙해진 결과로 여겨짐(Labbe et al. 2005). 탈카페인 녹차는 녹차 시장의 변화와 더불어 캔녹차 혹은 티벳녹차로의 제품화 가능성을 가질 것으로 여겨진다.

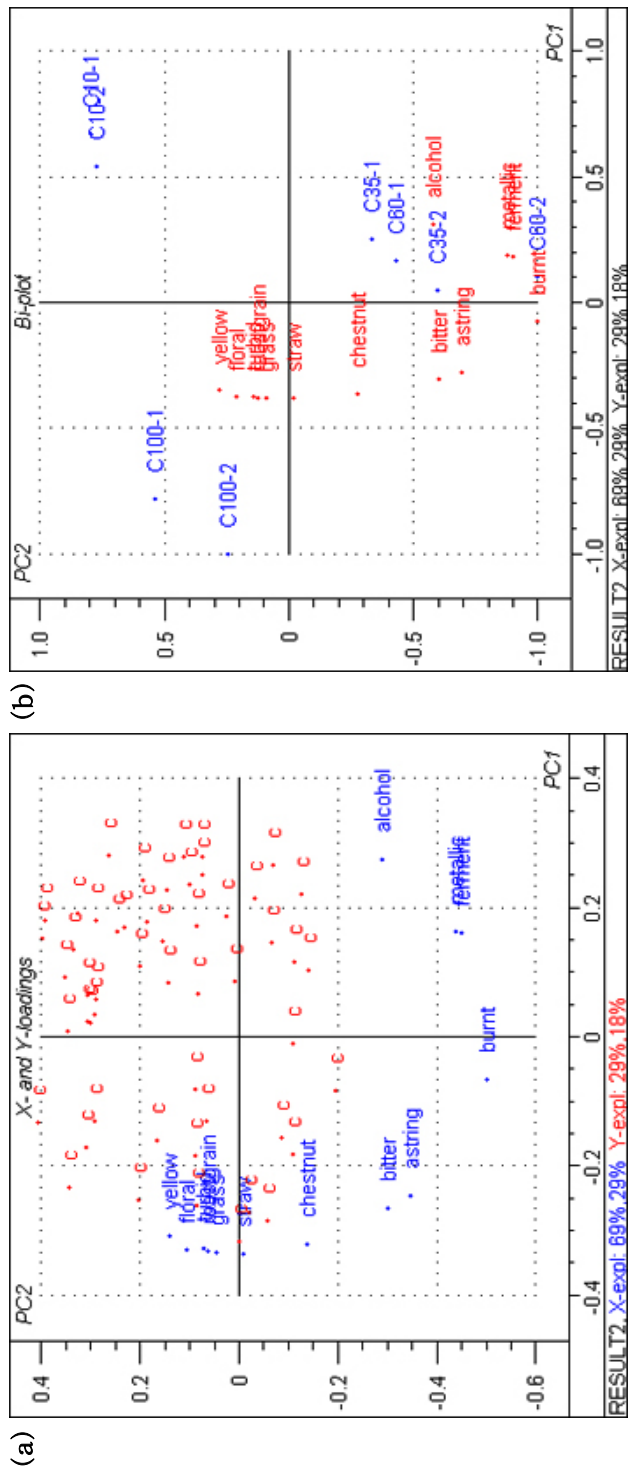


Fig. 12.1 PLS-R results for (a) X- and Y- loadings and (b) bi-plot (scores and loadings in one plot) indicating relationship between sensory attributes and consumer acceptability of group 1 (n=52) for decaffeinated green teas by SFE method

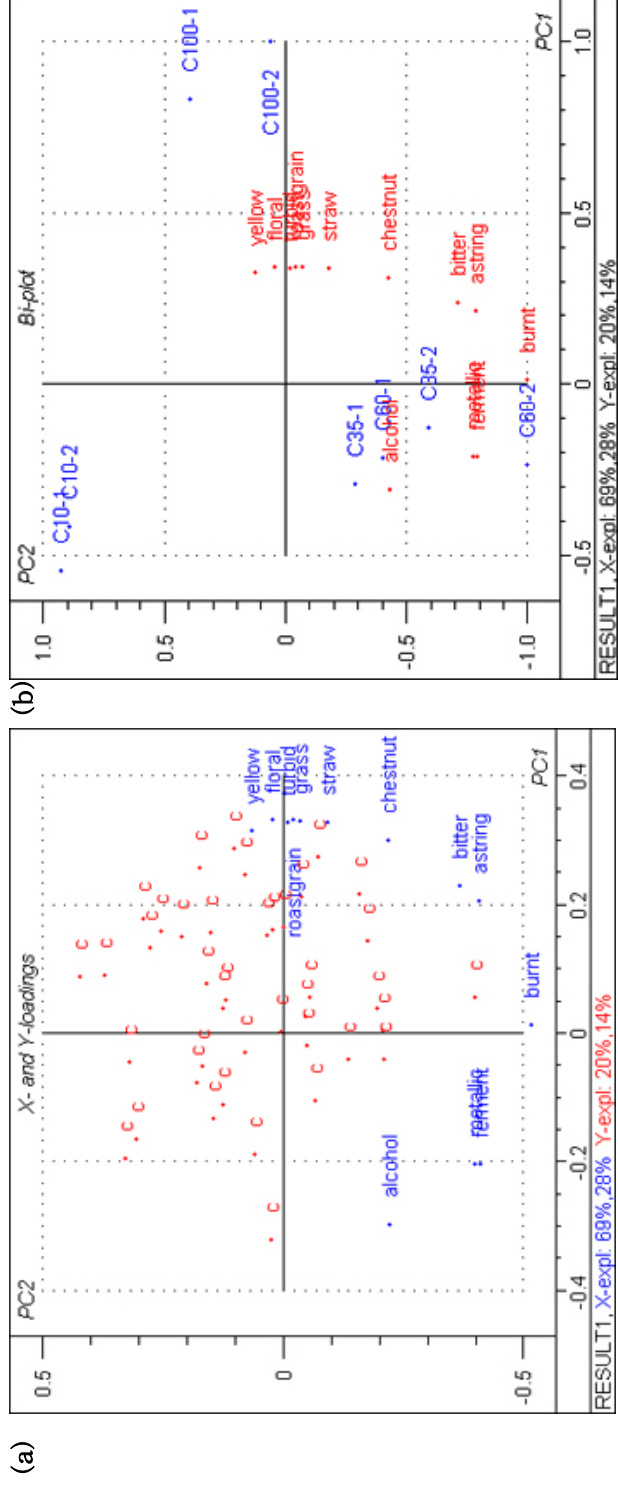


Fig. 12.2. PLS-R results for (a) X- and Y-loadings and (b) Bi-plot (scores and loading in one plot) indicating relationship between sensory attributes and consumer acceptability of group 2 (n=40) for decaffeinated green teas by SFE method

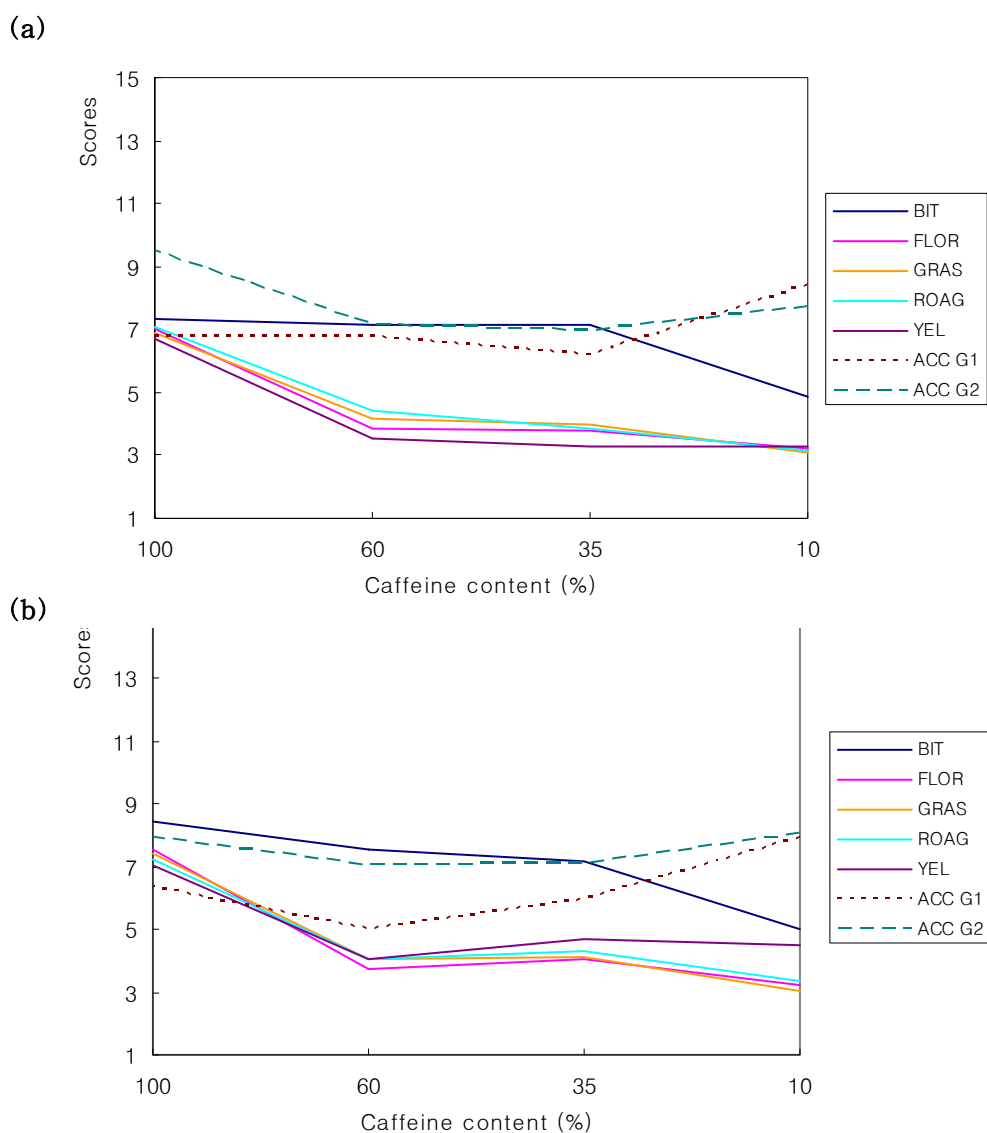


Fig. 12.3 Sensory attribute<sup>1)</sup> and consumer acceptability<sup>2)</sup> scores corresponding to caffeine content at (a) 1 min and (b) 2min infusion of decaffeinated green teas by SFE method

<sup>1)</sup>BIT, bitter taste; FLOR, floral; GRAS, grassy; ROAG, roasted grain, YEL, yellowness

<sup>2)</sup>ACC G1, consumer acceptability of group 1 (n=52), ACC G2, consumer acceptability of group 2 (n=40)

## 제 13 절 Ethyl acetate에 의해 탈카페인된 녹차엽의 관능검사

### 1. 패널 선정 및 훈련

녹차에 대한 묘사분석 패널은 식품공학과 대학원생 8명(연령 24-43)으로서, 묘사분석에 경험이 있고 관능검사에 관심과 참여 의지가 있는 사람들로 구성하였다. 선발된 패널들은 1주일에 3일씩 4주간 훈련받았으며, 매회 훈련에 소요된 시간은 평균 1시간이었다. 묘사용어의 개발, 특성의 정의 및 각 특성에 따른 표준물질 선정과정은 이전 묘사분석 과정과 유사하게 진행되었다. 개발된 용어 및 용어에 대한 정의는 table 13.1에, 용어에 따른 표준물질은 table 13.2에 각각 나타내었다. 훈련과정은 이전의 묘사분석과 마찬가지로 패널들이 시료와 평가방법에 익숙해지고 특성 강도평가에 대해 서로 일치된 결과를 보일 때까지 계속하였다.

### 2. 시료 준비 및 제시

관능검사를 위한 탈카페인 녹차의 제조에는 edible한 ethyl acetate(FCC grade; Sigma-Aldrich, Inc., St.Louis, MO, USA)를 사용하여 탈카페인 처리를 하였으며, 처리 공정과정은 앞선 방식과 동일하게 진행하였다.. 용매의 edible한 여부는 탈카페인 녹차의 이화학적 특성에 큰 영향을 주지 않았다. 묘사분석을 위한 시료를 제조 방법은 초임계 이산화탄소에 의한 묘사분석 방법과 같다. 제시 방법의 경우 randomized order에 의한 시료 제시 순서를 제외하고는 앞선 묘사분석의 방법과 동일하다.

### 3. 평가 내용 및 절차

녹차의 묘사분석 시에는 정량적 묘사분석(quantitative descriptive analysis, QDA) 방법(Stone and Sidel, 1992)을 기본으로 하고 스펙트럼 묘사분석(spectrum descriptive analysis) 방법(Munoz and Civil, 1992)을 일부 적용하였다. 향미특성 평가를 위한 시료는 개인 검사대의 어두운 적색 등 밑에 제시하여 색의 차이에서 오는 편견을 배제시켰으며, 외관 특성 평가를 위한 시료는 별도로 준비하고 새로운 번호를 붙여 light box(Superlight-III, Boteck, Siheong, Gyeonggido)의 day light(D65) 하에서 평가하도록 하였다. 외관 특성은 향미 특성의 평가가 먼저 이루어진 후에 평가하도록 하였다.

시료들은 한꺼번에 제시되었고 훈련 과정을 통해 개발된 특성 용어는 외관 특성 2가지와 향미 특성 13가지였으며(Table 13.1), 각각의 용어에 대한 표준물질을 선택하였다(Table 13.2). 사용한 척도 및 맛보는 방법은 이산화탄소 초임계 묘사분석 방법과 동일하다. 평가는 약 30분이 소요되었으며 4회 반복하여 수행되었다. 검사는 2일에 걸쳐 오전 11시와 오후 4시에 실시되었다.

#### 4. 통계분석

Ethyl acetate에 의한 탈카페인 녹차의 묘사분석 결과는 관능적 특성들과 시료 간에 유의적인 차이를 알아보기 위해 앞선 묘사분석 방법과 마찬가지로 다변량 분산분석, 분산분석을 실시하였다. 또한 시료들 간의 관능적 특성 차이를 한 눈에 볼 수 있도록 시료들의 특성별 평균값을 이용하여 spider web을 작성하였다. 모든 통계분석은 SPSS for Windows 12.0(Spss Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 수행하였다.

Table 13.1 Definitions of the descriptive attributes of decaffeinated green teas using ethyl acetate

Sensory Attributes	Definitions
Greenness	Intensity of green color of green tea
Turbidity	Turbidity of green tea
Sweet taste	Fundamental taste sensation of which sucrose is typical
Sour taste	Fundamental taste sensation of which sodium chloride is typical
Bitter taste	Fundamental taste sensation of which caffeine and quinine is typical
Jasmine	Aromatics associated with jasmine
Chrysanthemum	Aromatics associated with <i>Chrysanthemum</i>
Grassy	Aromatics associated with pounded grass
Black tea	Aromatics associated with black tea
Roasted grain	Aromatics associated with roasted grain
Chestnut shell	Aromatics associated with chestnut shell
Fermented/Deteriorated	Aromatics associated with Makgoli <sup>1)</sup>
Dried straw	Aromatics associated with dried straw
Metallic	Aromatics associated with metals, tinny, and iron
Astringency	The feeling which shrivels the tongue associated with tannins

<sup>1)</sup>A traditional Korean alcoholic beverage made by alcoholic fermentation of rice

Table 13.2 Reference samples for the descriptive attributes of decaffeinated green teas using ethyl acetate

Sensory Attributes	References samples
Greenness	
Turbidity	
Sweet taste	0.3% Sucrose (Ducksan Pure Chemical Co. Ltd., Ansan, Gyeonggido) solution
Sour taste	0.05% Citric acid (Ducksan Pure Chemical Co. Ltd., Ansan, Gyeonggido) solution
Bitter taste	0.07% Caffeine (Sigma-Aldrich, Inc., St.Louis, MO, USA) solution
Jasmine	25g Jasmine tea (Hyanggiropin Jasmine; 1 tea bag [Amorepacific Corp. Jinchun, Chungcheongbukdo] <sup>1)</sup> ) mixed with 45g green tea (1 tea bag [Shulloc Cha Jinhyang; Amorepacific Corp. Jinchun, Chungcheongbukdo] <sup>1)</sup> )
Chrysanthemum	25g Chrysanthemum tea (1 g Chrysanthemum tea [Amorepacific Corp. Jinchun, Chungcheongbukdo] <sup>1)</sup> ) mixed with 45g green tea (1 tea bag [Shulloc Cha Jinhyang; Amorepacific Corp. Jinchun, Chungcheongbukdo] <sup>1)</sup> )
Grassy	Mashed grass
Black tea	25g Black tea (1 g Black tea [ENGLISH BREAKFAST; TAYLORS of HARROGATE, ENGLAND] <sup>1)</sup> ) mixed with 45g green tea (1 tea bag [Shulloc Cha Jinhyang; Amorepacific Corp. Jinchun, Chungcheongbukdo] <sup>1)</sup> )
Roasted grain	70g brown rice green tea (1 tea bag [Amorepacific Corp. Jinchun, Chungcheongbukdo] <sup>1)</sup> )
Chestnut shell	30g Chestnut Shell (local Supermarket, Seoul) boiled with 500ml water at low heat for 10 min
Fermented/Deteriorate	25g Makgolli <sup>2)</sup> (Rice Makgolli; Seoul Takju, Seoul) mixed with mixed with 45g green tea (1 tea bag [Shulloc Cha Jinhyang; Amorepacific Corp. Jinchun, Chungcheongbukdo] <sup>1)</sup> )
Dried straw	10g Dried straw
Metallic	Stainless Steel Spoon
Astringency	0.3% Tannic acid (Ducksan Pure Chemical Co. Ltd., Ansan, Gyeonggido) solution

<sup>1)</sup>Tea infused with 200ml boiling water for 2 min

<sup>2)</sup>A traditional Korean alcoholic beverage made by alcoholic fermentation of rice

## 5. 에틸 아세테이트에 의해 탈카페인된 녹차엽의 관능검사 실험 결과

탈카페인 공정을 거친 녹차와 탈카페인 공정을 거치지 않은 녹차, 2종의 관능적 특성에 대하여 다변량 분산분석을 수행한 결과, 두 시료 간에는 전체적으로 유의적인( $P < 0.001$ ) 차이가 나타났다. 이에 따라 분산분석 결과, 모든 관능적 특성들에 있어 시료 간 유의적인( $P < 0.05$ ) 차이가 있었다(Table 13.3). Fig. 13.1의 Spider web을 살펴보면, 탈카페인 공정을 거치지 않은 시료(CO)는 색의 진한 정도, 탁한 정도, 쓴맛, 자스민 향미, 풀 향미, 홍차 향미, 구수한 향미, 밥껍질 향미, 마른 지푸라기 향미, 금속성, 뚝은 감각 특성의 강도가 높게 나타났으며, 탈카페인 공정을 거친 시료(DC)에서는 단맛, 신맛, 국화꽃 향미, 쉰 향미의 특성이 높게 나타났다. Ethyl acetate를 이용하여 탈카페인 공정을 통해 카페인을 감소시킴에 따라 쓴맛이 감소하고 그의 영향으로 단맛과 신맛이 증가하였으나, 녹차의 다른 다양한 향미 특성들이 탈카페인 공정을 거침에 따라 함께 감소하는 것을 알 수 있었다. 녹차의 향미 성분이라고 알려져 있는 catechin 성분의 감소에 따른 것으로 여겨진다. 또한 녹차 제품에 있어서 부정적으로 여겨지는 쉰 향미 특성이 높게 나타났다.

Table 13.3 Sensory characteristics<sup>1)</sup> of decaffeinated and untreated green teas<sup>2)</sup>

Sensory Attributes	CO	DC	F value
Intensity of green color	8.43	5.48	***
Turbidity	9.15	4.48	***
Sweet taste	4.90	7.94	***
Sour taste	5.10	7.90	***
Bitter taste	8.01	4.48	***
Jasmine	8.52	4.97	***
Chrysanthemum	4.40	8.23	***
Grassy	9.30	4.39	***
Black tea	8.13	4.87	***
Roasted grain	8.56	4.87	***
Chestnut shell	8.58	5.45	***
쉰 향미	4.90	9.13	***
Dried straw	8.16	4.97	***



Metallic	8.39	4.74	***
Astringency	8.45	5.19	***

<sup>1)</sup><0.05, <sup>2)</sup><0.01, <sup>3)</sup><0.001

<sup>2)</sup>See Table 1 for abbreviation

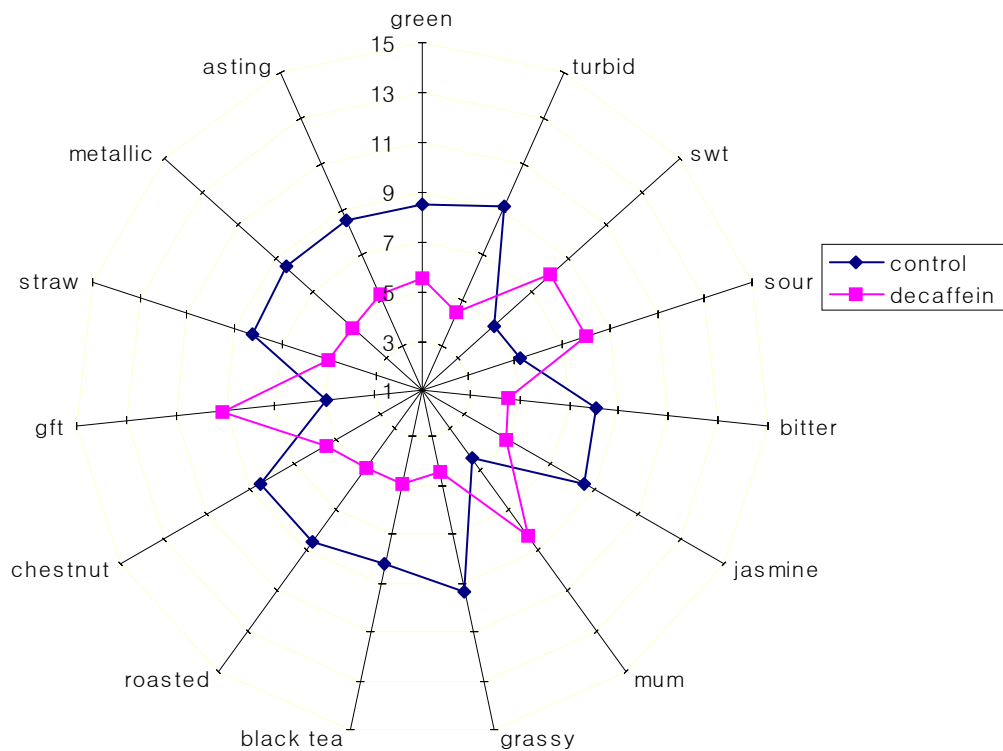


Figure 13.1 Spider web of sensory attributes<sup>1)</sup> of decaffeinated green teas using ethyl acetate and untreated green teas

\* See table 02 for abbreviation

<sup>1)</sup>Green, Greenness; Turbid, Turbidity; swt, Sweet taste; sour, Sour taste; bitter=Bitter taste; jasmine, Jasmine; mum, Chrysanthemum; grassy, Grassy; black tea, Black tea; roasted, Roasted grain; chestnut, Chestnut shell; Fermnt/Det, Fermented/Deteriorated; straw, Dried straw; metallic, Metallic; astring=Astringency

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

# 제 1 절 연구개발 착안점 및 달성도

## 1. 연구계획서의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도 (2004)	○ 카페인과 catechin의 선택적 분리조건 최적화	30
	○ 녹차추출물의 모델시스템 이용 생리학적 안전성 및 기능성 평가	28
	○ 녹차엽의 향기활성성분의 분석	27
	○ 녹차시장 현황 및 탈카페인 시장의 시장영향 조사 분석	15
2차년도 (2005)	○ 초임계이산화탄소이용 녹차엽의 선택적 탈카페인 추출조건 확립	30
	○ 탈카페인 녹차추출물의 생리학적 안전성 및 기능성 평가	30
	○ 초임계 탈카페인 녹차엽의 향기활성성분의 분석	20
	○ 초임계 탈카페인 녹차엽의 관능평가	20
3차년도 (2006)	○ Ethyl acetate이용 녹차엽의 선택적 탈카페인 추출조건 확립	15
	○ 녹차엽 탈카페인공정의 효율성 및 경제성 극대화	15
	○ 최적공정에서 얻은 탈카페인 녹차엽의 <i>in vivo</i> 안전성 평가	30
	○ Ethyl acetate 이용 탈카페인 녹차엽의 향기활성성분의 분석	20
	○ Ethyl acetate 탈카페인 녹차엽의 관능평가 및 소비자기호도 분석	20
최종평가	○ 녹차엽의 고효율 및 경제적 탈카페인 추출공정 개발	40
	○ 탈카페인 녹차의 생리학적 기능성 및 안전성 검증	30
	○ 탈카페인 녹차엽의 향미 및 관능특성 평가	30

## 2. 연구수행 후의 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도 (2004)	○ 카페인과 catechin의 선택적 분리조건 최적화	100
	○ 녹차추출물의 모델시스템 이용 생리학적 안전성 및 기능성 평가	100

	○ 녹차엽의 향기활성성분의 분석	100
	○ 녹차시장 현황 및 탈카페인 시장의 시장영향 조사 분석	100
2차년도 (2005)	○ 초임계이산화탄소이용 녹차엽의 선택적 탈카페인 추출조건 확립	100
	○ 탈카페인 녹차추출물의 생리학적 안전성 및 기능성 평가	100
	○ 초임계 탈카페인 녹차엽의 향기활성성분의 분석	100
	○ 초임계 탈카페인 녹차엽의 관능평가	100
3차년도 (2006)	○ Ethyl acetate이용 녹차엽의 선택적 탈카페인 추출조건 확립	100
	○ 녹차엽 탈카페인공정의 효율성 및 경제성 극대화	100
	○ 최적공정에서 얻은 탈카페인 녹차엽의 <i>in vivo</i> 안전성 평가	100
	○ Ethyl acetate 이용 탈카페인 녹차엽의 향기활성성분의 분석	100
	○ Ethyl acetate 탈카페인 녹차엽의 관능평가 및 소비자기도 분석	100
최종평가	○ 녹차엽의 고효율 및 경제적 탈카페인 추출공정 개발	100
	○ 탈카페인 녹차의 생리학적 기능성 및 안전성 검증	100
	○ 탈카페인 녹차엽의 향미 및 관능특성 평가	100

## 제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

### 1. 기술적 측면

- 새로운 탈카페인 공정개발로 식품 및 농산가공기술의 선진화
- 차별화 및 특화된 가공방법의 개발과 제품개발전략에 맞춘 차별화된 가공기술을 보유
- 현재까지 연구된 바가 없는 탈카페인 녹차의 다양한 생리활성효과를 검증하여 녹차제품 소비촉진
- 고부가가치 및 기능성 건강식품소재의 개발로 관련산업의 국제 경쟁력 향상에 이바지

### 2. 경제 · 산업적 측면

- 국내에서 재배가능한 녹차를 수출가능한 고급화된 차제품으로 개발하여 농민소득 증대에 기여
- 고급화된 탈카페인 녹차의 제품화로 새로운 소비시장 창출

- 녹차시장 개방에 따른 녹차의 고급화를 통한 값싸고 저품질의 외국산 수입 녹차와의 경쟁에서 비교우위 점유
- 무카페인 녹차의 생리활성연구로 기능성 소재로의 우수성 검증 및 홍보
- 고급화된 가공기술을 인도, 중국, 케냐 등의 주요 차생산국에 대한 기술수출을 통한 외화 획득
- 탈카페인 녹차의 우수한 생리학적 안전성 및 기능성이 검증되면 새로운 해외시장 확보 가능성
- 종래의 녹차와는 차별되는 새로운 의미의 상품에 대한 수요창출과 동시에 건강 지향형 소비자의 다양한 욕구를 충족시키는 제품을 생산
- 탈카페인 녹차엽이라는 상품의 브랜드로서의 가치를 높일 수 있는 효과

## 제 5장 연구개발 결과의 활용계획

## 제 1 절 연구 활용 방안

○ 탈카페인 녹차의 제조공정기술을 국내외 특허출원한다.

### ▲ 특허출원

· 제 1 세부(고려대 김경현 교수팀)

- 발명명칭 : 카페인 제거된 녹차 분말의 제조방법 및 그 방법에 의해 제조된 녹차 분말
- 출원번호 : 10-2006-0104743(현재 등록심사 중)
- 발명자 : 김경현, 박형석, 이희진, 신민혜, 김선형
- 출원인 : 고려대학교 산학협력단

○ 탈카페인 녹차의 우수한 생리학적 안전성, 기능성, 향미 특성 연구결과를 국제학술지에 발표하여 세계에 홍보한다.

· 제 1 세부(고려대 김경현 교수팀)

- 논문제목 : Effect of mass transfer on the removal of caffeine from green tea by supercritical carbon dioxide
- 저 자 : **박형석**, 최형균, 이성준, 박권우, 최성길, **김경현\***
- 저널명 : The Journal of Supercritical Fluids
- 게재일자 및 권, 호, 페이지 : 2007. 3. 6(accepted), In Press

- 논문제목 : Effects of cosolvents on the decaffeination of green tea by supercritical carbon dioxide
- 저 자 : **박형석**, 이희진, 신민혜, 이광원, 이호정, 김영석, 김광욱, **김경현\***
- 저널명 : Food Chemistry
- 게재일자 및 권, 호, 페이지 : 2007. 4.25(Accepted), In Press

제 2 세부(고려대 이광원 교수팀)

- 논문제목 : 초임계이산화탄소를 이용한 탈카페인 녹차 열수추출물의 포유동물 세포주를 이용한 염색체이상시험
- 저 자 : **구윤창**, 이현순, 박병규, 김은진, 이선주, 김경현, 김영석, 김광욱, 정영신, **이광원\***
- 저널명 : Environmental Mutagens & Carcinogens

· 게재일자 및 권, 호, 페이지: 2006. 7, 26, 3, 63-68

- 탈카페인 녹차의 공정이 경제성이 있다고 판단되면 관련기업에 기술이전한다.
- 개발된 탈카페인 녹차엽을 녹차제품이외에도 건강기능성 식품이나 화장품 원료 등 관련 산업에서 이용하도록 한다.
- 생리학적 안전성과 향미특성을 갖춘 탈카페인 녹차의 제조 공정의 완성 후 전남대학교와 협력하여 전남 보성지역 녹차 생산자 및 가공업자를 선정하여 제품화 및 산업화 착수할 계획이다.

## 제 2절 추가 연구의 필요성

위의 실험결과를 보면 초임계이산화탄소를 이용하여 녹차내에 있는 카페인을 제거하는 공정에서 우수한 실험결과를 얻어 내었고 관능검사에서도 좋은 결과를 얻었지만 녹차 고유의 향을 중요시 하는 소비자들의 기호를 맞추고 좀 더 생리학적 안전성이 우수한 탈카페인 녹차엽을 개발함과 동시에 제품화가 되기 위해선 녹차내에서 중요한 생리활성물질인 EGCG 손실을 좀 더 최소화 하는 공정을 개발해야 한다. 또한 탈카페인 하는 공정 중에 소실되는 향기성분도 보강하기 위해 향후 초임계이산화탄소를 이용하여 소실된 향기성분을 재흡착 시키는 실험이 필요 할 것으로 사료된다.



## 제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학 기술 정보

과제를 수행해오던 지난 3년간 초임계이산화탄소를 이용한 여러 실험 들이 논문이나 특허 및 학술대회에 발표 되었고 초임계 이산화탄소 뿐만 아니라 여러 가지 방법을 통해 여러 식물에 카페인을 제거 하기위한 연구 활동이 진행되어왔으며 녹차내의 카테킨류의 여러 생리활성을 연구와 향기성분 연구도 진행되어 오고 있지만 아직까지 초임계이산화탄소를 이용한 탈카페인 녹차의 제조 공정이나 생리활성 및 향기성분 연구에 대한 논문은 나와 있지 않다. 그래서 위의 실험들이 현재 여러 국 내외 저널에 게재되었거나 투고중에 있고 국내 특허출원 하여 심사결과를 기다리고 있다. ※ 연구결과활용 계획서 참조

## 제 7 장 참고문헌

- 김영걸. 2001. “녹차가공분야의 문제점 및 대책.” 장원사업(주)
- 김영석, Analysis of Flavors in Foods-How to approach and how to use?. 식품과학과 산업. 2001;34(3):73-79.
- 김정미, 이영춘, 김광욱. 2003. 열풍건조 조건에 따른 은행분말의 이화학적 및 관능적 특성. 한국식품과학회지 35;(3):393-398.
- 김종태. 2000. “(주)한국차문화협회.” 제5-6호.
- 농림부. 2001년도 “특용작물 재배실적.”
- 박문호. 2003. “우리나라 녹차산업의 경쟁력 제고방안.” 농촌경제, 제26권 제1호.
- 정동효, 김종태, 2003, 차의 과학, 대광서림
- 최성희. 한국산 시판녹차의 향기성분에 관한 연구. 한국식품과학회지. 1991;23: 98-101.
- 최성희, 배정은. 1996, 지리산 녹차의 향기성분. 한국영양식량학회지. 1996;25: 478-483.
- Anonymous. (2003). Caffeine. Encyclopdia Britannica Online.
- Ashihara, H. and A. Crozier. 2001, Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. Trends Plant Sci. 6: 407-413
- Bablok W et al. A General Regression Procedure for Method Transformation. J Clin Chem. Clin Biochem 1988;26:783-790
- Baker, P. S. Natural decaf could brew trouble for farmers. Nature. 2003;424: 613
- Balbuena P. B., Campanella EA, Gribaudo LM. Correlation of solubilities of caffeine in supercritical solvents using a lattice model. J. Chem. Eng. Jpn. 1993;26:323-5.
- Birtigh A., Brunner G. Regeneration of loaded supercritical fluids. J. Supercrit. Fluids. 1996;9:227-33.
- Brunner G. Extraction of caffeine from coffee with supercritical solvents, Presented at Proceedings of the 1st International Symposium on Supercritical Fluids, Nice, France, Oct. 17-19, 1988.
- Cho, I.H., Kim, T.H., Cho, S.K., Lee, H.J., Kim, Y.S.. Analysis of volatile compounds in

bulgogi. Food Sci. Biotechnol. 2002;11(3): 303-309

Coffey M. P., Krukonis V. J. Development of submicron monodispersed aerosol generator employing supercritical fluid nucleation, Presented at Proceedings of the 2nd International Symposium on Supercritical Fluids, Boston, MA, May 20-22, 1991.

Data on file at Boehringer Mannheim

D.J.Reed, J.R.Babson, P.W.Beatty et al., High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide and related thiols and disulfides, Analytical biochemistry 106 (1980) 55-62

Guobin Sun, Sheau-Fung Thai, Douglas B. Tully, Guy R.Lamvert, Amver K. Goetz, Douglas C. Wolf, David J. Dix, Stephen Nesnow, Propiconazole-induced cytochrome P450 gene expression and enzymatic activities in rat and mouse liver, Toxicology Letters 155 (2005) 277-287

Hubert, P. and O. Vitzthum. 1983, Process for the extraction of caffeine from super-critical solutions. US Patent 4,411,923

Johannsen M., Brunner G. Solubilities of the xanthenes caffeine, theophylline and theobromine in supercritical carbon dioxide. Fluid Phase Equilib. 1994;95:215-26.

Jun, H.R. and Kim, Y.S. 2002, Comparison of volatile compounds in red pepper (*Capsicum annuum* L.) powders from different origins. Food Sci. Biotechnol. 11(3): 293-302

Kai-Jin Wang, Ying-Jun Zhang, Chong-Ren Yang Antioxidant phenolic compounds from rhizomes of *Polygonum paleaceum*, Ehtnopharmacology 96 (2005) 483-487

Kai-Jin Wang, Ying-Jun Zhang, Chong-Ren Yang Antioxidant phenolic compounds from rhizomes of *Polygonum paleaceum*, Ehtnopharmacology 96 (2005) 483-487

Kakuyama T, Kimura S, Hashiguchi Y. Fully automated determination of HDL-cholesterol from human serum with Hitachi911 [Abstract]. ChinChem 1994;40:1104.

Karas M, Chakrabarti SK. Caffeine potentiation of allyl alcohol-induced hepatotoxicity. II. In vitro study. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 20(2) (2001) 155-64.

- Karas M, Chakrabarti SK. Caffeine potentiation of allyl alcohol-induced hepatotoxicity. II. In vitro study. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2001;20(2): 155-64.
- Kato, M. and Shibamoto, T. 2001, Variation of major volatile constituents in various green teas from southeast Asia. *Agric. Food Chem.* 49: 1394-1396.
- Keith Dipetrillo, Sheryl Wood, Jenna Bement, Elizabeth Jeffery et al., Effect of caffeine on acetaminophen hepatotoxicity in cultured hepatocytes treated with ethanol and isopentanol, *Toxicology and Applied Pharmacology* 185 (2002) 91-97
- Kim, K.-O. and M. O'Mahony. 1998. A new approach to category scales of intensity I: Traditional versus rank-rating. *J. Sensory Stud.* 13:241-249.
- Kim, T.H., Kim T.H., Shin, J.H., Yu, E.J., Kim, Y.S., and Lee, H.J. 2002, Characteristics of aroma-active compounds in the pectin-elicited suspension culture of *Zanthoxylum piperitum* (prickly ash). *Biotech. Letters* 24: 551-556
- Kim, T.H., Lee, S.M., Kim, Y.S., Kim, K.H., Oh, S., Lee, H.J. Aroma dilution method using GC injector split ratio for volatile compounds extracted by headspace solid phase microextraction. *Food Chem.* 2003;83: 151-158
- Kim Y, Lee YC, Kim KO. Optimum roasting and extraction conditions and flavor characteristics of roasted malt extract. *Cereal Chem.* 1998;75(3): 282-288
- Kumasawa, K. and Masuda, H. Identification of potent odorants in different green tea varieties using flavor dilution technique. *Agric. Food Chem.* 2002;50: 5660-5663.
- Kumazawa, K. and Masuda, H. Identification of potent odorants in Japanese green tea (Sen-cha). *Agric. Food Chem.* 1999;47: 5169-5172.
- Labbe, D., Damevin, L., Vaccher, C., Morgenegg, C. and Martin, N. 2006. Modulation of perceived taste by olfaction in familiar and unfamiliar beverages. *Food Qual. Prefer.* 17: 582-589.
- Mehr C. B., Biswal R.N., Collins J. L., Cochran H. D. Supercritical carbon dioxide extraction of caffeine from guarana. *Supercrit. Fluids* 1996;9: 185-91.
- Munoz, A. M. and Civil, G. V. 1992. The spectrum descriptive analysis method. In *Manual on Descriptive Analysis Testing for Sensory evaluation*; Hootman, R. C., ed.; American Society for Testing and Materials: Philadelphia pp. 22-34.

- Musto J, Lawlor JF. HDL-cholesterol:online separation and analysis utilizing an automated chemistry analyzer[abstract]. Clin Chem 1993;39:1125
- Nawrot, P., S. Jordan, J. Eastwood, J. Rotstein, A. Hugenholtz and M. Feeley. Effects of caffeine on human health. Food Additives and Contaminants, 2003;20:1-30.
- Ogita, S., H. Uefuji, Y. Yamaguchi, N. Koizumi, H. Sano. 2003, Producing decaffeinated coffee plants. Nature. 423: 823
- Okada M., Matsui H., Ito Y., Fujiwara A.: Low density lipoprotein cholesterol can be chemically measured: A new superior method. J Lab Clin Med 195-201:132(1988)
- Pan, X., G. Niu, and H. Liu. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. Chem. Eng. Process. 2003;42: 129-133
- Park JK, Kim SS, Kim KO. Effect of milling ratio on sensory properties of cooked rice and on physicochemical properties of milled and cooked rice. Cereal Chem. 2001;78(2): 151-156.
- Peker H., Srinivasan M. P., Smith J.M., McCoy B. J. Caffeine extraction rates from coffee beans with supercritical carbon dioxide. AIChE J. 1992;38:761-70.
- Richmond W: Preparation and properties of a cholesterol oxidase from Nocardia sp. And its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. Clin Chem 19:1350-1356(1973)
- Roeschlau P, Bernt E, and Gruber WJ: Enzymatic determination of total cholesterol in serum. Clin Chem Clin Bio Chem 12(5):226 (1974)
- Shimoda, M., Shingematsu, H., Shiratsuchi, H., and Osajima, Y.J. Comparison of the odor concentrates by SDE and adsorptive column method from green tea infusion. Agric. Food Chem. 1995;43: 1616-1620.
- Shimoda, M., Shingematsu, H., Shiratsuchi, H., and Osajima, Y. Comparison of volatile compounds among different grades of green tea and their relations to odor attributes. J. Agric. Food Chem. 1995;39: 1275-1279.
- Stone, H. and Sidel, J. L. 1992. Sensory evaluation practices, 2nd ed. Academic Press: London, United Kingdom.

Thierry Goasduff, Yvonne Dreano, Bernard Guillois et al., Induction of liver and kidney CYP1A1/CYP1A2 by caffeine in rat, *Biochemical Pharmacology* 52 (1996) 1915–1919

Third Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel 111), NIH Publication No. 01-3670, May 2001

Thomas L (ed.). *Labor und Diagnose*, 4th edition Marburg: Die Medizinische Verlagsgesellschaft, 1992: 208"

Williams, E. J. 1949. Experimental designs balanced for the estimation of residual effects of treatments. *Australian Journal of Scientific Research*, 2(2): 149–168.

Yamaguchi, K. and Shibamoto, T. 1981, Volatile constituents of green tea, Gyokuro (*Camellia sinensis* L. var Yabukita). *Agric. Food Chem.* 29: 366–370.

Zoran Maksimovic, Dorde Malencic, Nada Kovacevic, Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts, *Bioresource Technology* 96 (2005) 873–877

Zosel, K. 1974, Process for recovering caffeine. US Patent 3,806,619



## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.