

녹차의 고품질화를 위한 저장기술 개발
(Development of preservation technology
for extending shelf-life of
green tea with high quality)

연구기관
경상대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “녹차의 고품질화를 위한 저장기술 개발에 관한 연구” 과제의
보고서로 제출합니다.

2009 년 5 월 20 일

주관연구기관명 : 경상대학교

주관연구책임자 : 조 성 환

세부연구책임자 : 최 성 길

세부연구책임자 : 허 호 진

연 구 원 : 신 영 희

연 구 원 : 정 창 호

연 구 조 원 : 박 기 덕

연 구 조 원 : 김 지 흥

연 구 조 원 : 정 희 록

연 구 조 원 : 강 란

연 구 조 원 : 강 성 원

연 구 조 원 : 장 주 빈

연 구 조 원 : 황 기 훈

연 구 조 원 : 김 현 정

연 구 조 원 : 진 수 일

협동연구기관명 : 경남대학교

협동연구책임자 : 이 승 철

연 구 조 원 : 이 정 민

연 구 조 원 : 서 혜 경

연 구 조 원 : 유 동 현

요 약 문

I. 제 목

녹차의 고품질화를 위한 저장기술 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구사업의 최종목표는 녹차의 품질유지를 위하여 녹차의 제품유형별 저장환경에 따른 생리학적 유용성분 및 기능, 미생물 안전성 등을 포함한 저장특성을 규명하고, 이를 토대로 녹차 제품의 최적 저장방법을 도출하는데 있음. 또한, 녹차의 생리활성 효과를 증진시키는 추출공정과 최적저장기술을 접목하여 고품질·고기능성 녹차 제품을 개발하고, 고품질의 녹차저장기술을 농가 및 가공업체에 보급하여 녹차산업의 국제 경쟁력을 높이고 국민건강 향상에 기여함을 목표로 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 녹차제품의 저장안정성 개선방안 구축 및 녹차유용물질의 추출법 개선
 - 저장환경에 따른 제품유형별 녹차시료 제조
 - 녹차 침출액의 저장성 향상을 위한 방안 강구
 - 분말녹차의 저장환경에 따른 흡습특성 및 안정성 규명
 - 녹차제품의 저장성 향상을 위한 방안구축
 - 감마선조사, 초음파처리, 원적외선조사, 포장기술개발 등
 - 추출공정 개선을 통한 유용물질의 추출효율 최적화
- 녹차제품의 미생물 오염 특성조사 및 녹차성분의 항균작용 규명
 - 녹차제품(잎차, 분말, 침출액)의 저장 중 미생물 오염 특성조사
 - 녹차추출물의 항균 작용구명
 - 저장환경에 따른 항균력의 변화조사
 - 녹차의 항균물질 분리 및 특성구명
 - 녹차추출물을 첨가한 농수축산물 및 그 가공품에 대한 항균기능성
- 녹차제품의 저장에 따른 생리활성물질 변화조사
 - 녹차가공품의 생리 활성 물질 측정법 확립
 - 녹차의 저장환경(온도, 상대습도, 광선, 공기)이 녹차가공품의 생리활성물질에 미치는 영향조사

- 녹차의 저장방법(원적외선 및 감마선 조사, 진공 및 질소충전 포장)이 녹차 가공품의 생리활성물질에 미치는 영향조사
- 추출방법 및 조건에 따른 생리활성물질의 함량 분석
- 녹차의 제품이 뇌신경질환에 미치는 영향 및 저장 방법에 따른 생리활성능의 변화조사
- 녹차제품의 퇴행성뇌신경 질환에 대한 효과 조사
- 저장 환경에 따른 항산화능 변화 및 세포손상변화 측정
- 저장 환경에 따른 뇌신경세포 보호효과 변화 및 신호전달물질로서의 acetylcholine 분해효소 저해능 변화 측정
- 저장 방법에 따른 생리활성능(항산화 및 뇌신경보호 등)에 미치는 영향조사

IV. 연구개발결과

1. 녹차엽의 저장환경에 따른 특성을 분석한 결과, 상대습도가 69, 81%인 환경조건에서 가용성 고형분, 환원력이 저장에 따라 감소하였다.
2. 녹차 분말의 저장시 상대습도가 69, 81%인 환경조건에서 가용성 고형분, caking behavior(몽침현상)이 크게 증가하였다. 따라서 상대습도가 높은 조건에서의 저장시 녹차엽과 분말의 저장안정성을 유지 할 수 있는 저장 방법의 개선 필요하여, 다음 연구에서 저장방법을 달리하여 저장안정성을 개선하였다.
3. 녹차 침출액은 냉장저장시에 항산화 활성, 외관, 색도 등의 물리화학적 특성이 저장기간동안 변화없이 유지하였기 때문에 냉장저장이 녹차 침출액의 저장에 가장 적합할 것으로 사료된다.
4. 진공포장한 후 녹차분말을 저장하였을 때, 저장에 가장 열악한 조건인 상대습도 81%의 조건에서 가용성 고형분, 색도, 외관, 항산화 활성이 저장시 일정하게 유지되었고, caking behavior(몽침현상)의 경우 대조구에서 약 13%에서 84%까지 증가한데 반해 진공포장한 시료에서는 일어나지 않았기 때문에, 진공포장이 녹차 분말의 저장시 안정성 증대에 적합한 것을 판단된다.
5. 감마선, 원적외선 처리에 따른 가용성 고형분 함량, 항산화 활성(DPPH radical scavenging activity, ABTS radical scavenging activity, reducing power)등의 물리화학적 특성의 유의적인 차이는 없었다.

6. 초음파 추출로서 가용성 고형분, catechins, 총페놀화합물 함량, flavonol compound 함량 등의 녹차의 유용성분의 추출을 증대시킬 수 있는 것으로 분석되었다.
7. 반응표면분석법을 통해 분석한 결과, 녹차의 기호성을 나타내는 척도가 되는 N/T value(총질소화합물/총탄닌)가 약 56~64℃에서 18분 미만으로 추출할 경우에 가장 높게 나타나 고기호성 녹차음료의 제조를 위한 최적조건으로 도출됨.
8. 녹차 분말음료의 제조공정을 확립하였고, 저장 안정성을 분석한 결과, 제조공정에 따라 제조한 녹차 분말음료가 저장시에도 분산상태를 잘 유지 하는 것으로 나타났다.
9. 저장기간에 따라 분말 녹차 추출물과 잎 녹차 추출물 모두 의미 있는 신경세포 보호효과가 관찰되었으나 4주간의 저장 조건 (수분활성도: 0.81)에서는 신경세포에 대한 보호효과의 차이는 그 차이가 크지 않은 것으로 판단된다.
10. 다만 분말녹차의 경우 상대적으로 유용성분의 추출 효율성이 우수한 것으로 판단되어 그 결과에 있어 비교적 일관된 양식을 보이는 것으로 판단된다. 특히 신경세포 사멸에 대한 보호효과를 나타내는 MTT assay의 경우, 분말 녹차 추출물은 저장기간이 짧은 것 (fresh, 1 week group)이 높은 보호효과를 나타낸 반면 잎 녹차 추출물은 저장기간이 짧은 것 (fresh, 1 week group)과 함께 3 weeks group도 높은 보호효과를 보여주었다.
11. 녹차 sample을 확보한 직후인 'Fresh'부터 각각의 수분활성도별 (A_w 0.81, 0.69, and 0.23)로 4주까지 저장하면서 1주 간격으로 녹차 잎과 분말 추출물에 대한 항산화 실험을 실시하였으나 환원력, DPPH/ABTS radical scavenging activity, FRAP assay, 그리고 superoxide anion radical scavenging activity에서의 결과는 저장기간 (fresh~4 weeks)과 수분활성도별 차이를 구분할 수 없는 정도였다.
12. 3개월 정도의 저장조건에서는 저장 온도 및 수분활성도의 차이가 항산화 활성정도에는 크게 기여하지 못하는 것으로 판단된다. 다만 생리활성물질을 보다 효율적으로 추출할 수 있는 녹차의 상태가 더욱 중요하고 그 상태는 잎 보다는 분말의 상태가 더 우수한 것으로 판단된다.

13. 퇴행성 뇌신경질환으로서의 치매 개선효과를 유도할 수 있는 AChE (acetylcholin- esterase)에 대한 효소저해 활성도를 기준으로 요약하면, 4 주까지의 저장조건에서 녹차 잎의 조건별 열수 추출물의 AChEi activity 는 fresh 조건의 추출물이 가장 우수하였으며 특히 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 고농도에서 최대 효소 저해 활성 (42%)이 나타났다.
14. 3개월까지의 저장조건에서는 수분활성도별 농도 의존적인 효소저해 활성을 볼 수 있었고, 역시 가장 처리 농도가 높은 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 경우가 최대 효소저해 활성 (AChEi activity)을 나타내고 있었다. 다만 3개월 저장 조건의 100 그리고 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 처리군 에서 20% 내외의 AChEi effect가 나타난 것과, 수분활성도 0.81과 0.23 녹차 잎 열수 추출물의 상대적으로 높은 효소저해 활성도의 발생 원인은 생리활성 성분에 대한 구체적인 characterization 연구가 지속되어야하는 필요성을 남기는 것으로 사료된다.
15. 또한 3개월 저장 후 측정한 분말 녹차의 AChEi activity는 저장 온도에 따른 차이는 크지 않은 것으로 판단되지만, 수분활성도의 차이는 수분활성도 0.81의 효소저해 활성도가 상대적으로 우수함을 알 수 있다. 특히 수분활성도 0.23의 열수 추출물이 4주 저장한 sample 추출에 비해 효소 활성 저해도가 크게 향상된 것으로 사료되지만 이를 확인하기 위해서는 저장조건별 생리활성 물질의 구조변화 등의 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다. 또한 같은 조건의 녹차 잎 추출물에 비해 acetylcholin-esterase 효소저해 활성도는 분말 녹차의 것이 우수한 것으로 보인다.
16. 전체적으로 녹차 잎 추출물 보다는 분말 녹차 추출물의 경우가 그리고 저장된 sample보다는 fresh sample의 AChEi activity가 상대적으로 높았고 이는 생리활성 물질의 추출효율성과 생리활성 물질의 characterization 변화 측면에서 기인되는 것으로 판단된다. 또한 본 연구팀에서 구성한 저장 조건에서, 4주간의 짧은 저장기간이 3개월 저장조건 보다는 우수한 효소저해 활성도를 나타냈다.
17. 수분활성도 측면에서는 수분활성도 0.81의 조건을 갖는 sample에서의 효과가 비교적 우수했고, 3개월 저장하는 동안의 저장 온도 조건은 효소저해 활성도에 큰 차이를 보이는 요소로 작용하지 못했다. 다만 상온이나 냉장조건 보다는 냉동상태의 저장조건이 다소 우수한 것으로 판단된다.
18. 또한 3개월 저장조건을 기준으로 효소저해 활성 (AChEi)과 항산화 결과

를 비교하면, 3개월의 저장조건에서는 저장 온도 및 수분활성도의 차이가 항산화 활성 정도에는 크게 기여하지 못하는 것으로 판단되며 결국 생리활성물질을 보다 효율적으로 추출할 수 있는 녹차의 상태와 처리 또는 섭취 농도가 더욱 중요한 것으로 사료되고, 추출 효율을 증가시키기 위해서는 잎 보다는 분말의 상태가 더 우수한 것으로 판단된다.

19. 식품원료 및 가공식품의 선도유지를 위한 천연항균소재로서의 녹차추출물은 변패미생물인 Gram(+), Gram(-), 효모 및 곰팡이에 대해서 농도에 비례하여 우수한 항균효과를 보였다. 미생물 생육저해 농도곡선의 측정에서는 녹차추출물 500 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 미생물의 생육이 완전히 억제되는 것을 볼 수 있었다.
20. 녹차추출물은 광범위한 범위의 열처리의 온도와 pH에서 탁월한 항균력을 보임으로써 열($40^{\circ}\text{C} \sim 150^{\circ}\text{C}$)과 pH(3~11)에 안정한 것으로 나타났다.
21. Scanning electron microscope (SEM)를 이용한 전자현미경적 관찰에서는 SEM의 결과 Gram(+)^균, Gram(-)^균, 효모 및 곰팡이에 이르기까지 미생물의 세포형태가 변화되고, 항균물질에 의하여 균체 세포는 세포막의 기능이 파괴되어 세포내용물이 균체 외부로 유출되어 균체의 생육이 억제되는 것을 볼 수 있었다. 이러한 세포막의 삼투기능은 녹차추출물이 미생물의 세포막 기능에 미치는 영향을 알아보기 위한 β -galactosidase 활성 변화에서 기질로 사용한 O-nitrophenyl-galactopyranoside(ONPG)가 녹차추출물처리시 가수분해되어 미생물의 세포막 삼투기능이 파괴되는 것으로도 확인할 수 있었다. 이러한 항균작용에 연유하여 녹차추출물 처리는 뛰어난 미생물 세포의 생육 억제 효과를 보여 줄 수 있는 것으로 판단되었다.
22. 녹차추출물에서 항균력을 가지는 항균활성물질을 column chromatography방법, nuclear magnetic resonance(NMR) spectrophotometer 및 Mass spectrophotometer 분석법으로 분리·동정한 결과, (+)-catechin, (-)-catechin, (-)-epicatechin gallate 및 (-)-epigallocatechin gallate 등으로 확인되었다.
23. 녹차추출물의 안전성 시험결과, 쥐에 경구 투여하였을 때의 LD₅₀값은 5,950 mg/kg(95% 신뢰도)이었으며, 토끼의 피부에 대한 독성 또한 약한 편으로 녹차추출물은 비교적 안전한 천연추출물로 판단할 수 있는 것으로 나타났다.
24. 녹차추출물을 오염미생물에 의한 부패 및 변질을 방지하여 저장성을 향

상시킬 수 있는 천연 식품보존료로 개발하는데 필요한 기초자료를 마련하고자, 절임배추, 단무지, 김치제조용 배추, 반찬용 샐러드, 소고기, 멸치, 두부, 어묵 등과 같은 농수산물 식품원료 및 가공식품에 대한 처리효과를 조사하였다. 실험결과, 낮은 농도의 처리한 후, 풍건하여 저장한 대부분의 농수산물 식품원료 및 가공식품의 경우, 무처리한 대조구에 비하여 상당기간 동안 선도유지기간을 연장할 수 있었으며, 오염미생물의 수를 크게 감소시킬 수 있었다.

25. 저장 조건이 분말녹차의 생리활성물질의 변화에 미치는 영향을 조사하기 위해 상대습도(23, 69, 81%)와 온도(-20, 4, 20°C)를 달리하여 3달간 저장한 후, 녹차를 제조하여 성분을 분석하였다. 상대습도 23%, 4°C의 조건에 저장한 경우에서 총 페놀 함량, 총 플라바놀 함량, 아스코르브산 함량이 가장 높았다. 카테킨류도 상대 습도 23%, 4°C에 저장하였을 때 가장 높았는데 주된 카테킨인 EGC와 EGCG는 초기의 16.9와 27.3 mg/g에서 3달 후에는 각각 24.3과 36.5 mg/g으로 증가하였다. 또한 카페인도 같은 조건에서 초기의 20.7 mg/g에서 3달 후에는 30.7 mg/g으로 증가하였다.
26. 그러나, 상대습도가 높고 온도가 -20°C나 20°C에 저장한 경우에는 상대적으로 각 성분들이 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 분말 녹차의 상대습도와 저장 온도가 녹차의 품질 보존에 매우 중요하며, 낮은 습도에서 냉장 상태로 저장하는 것이 녹차의 품질 유지에 유리함을 의미한다.
27. 액차 녹차를 제조한 후, 빛 차단 여부, 비타민 C 첨가 여부, 질소 치환 여부 등의 조건을 달리하여 4°C에서 28일간 저장한 후, 유용 성분을 분석하였다. 총페놀함량의 경우 저장 초기에 비하여 저장 후 모든 경우에 73±2% 범위로 감소하였다.
28. DPPH 라디칼 소거능은 저장 초기에 비하여 빛 차단, 질소 충전, 비타민 C 첨가 (30 mg/100mL) 녹차에서 92.93%로 가장 높았다. 유용 카테킨 EGCG는 28일간 저장 후에 상기 조건 녹차에서 녹차 음료는 136.47%로 가장 높았다. 이상의 결과로 액상 녹차의 저장에서 빛, 질소 치환, 비타민 C가 매우 중요함을 알 수 있었다.
29. 녹차 제품의 저장방법이 생리활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 감마선 5kGy를 조사한 잎녹차, 90°C에서 10분간 원적외선을 처리한 잎녹차, 무처리 잎녹차를 각각 진공상태와 상대습도 81%의 상태에서 3달간 저장한 후 분석하였다.

30. 무처리구의 경우 진공상태에서는 저장한 후에 페놀 함량이 증가하였고, 상대습도 81%의 조건에서는 감소하였다. 원적외선 경우에는 저장한 후에 모두 감소하였지만 진공상태에 저장한 경우에 높은 페놀 함량을 나타내었다. 플라바놀 함량은 모든 경우에서 저장 후에 감소하였으며, 진공 상태에 저장한 녹차제품이 상대습도 81%에 저장한 경우보다 높은 플라바놀 함량을 나타내었다.
31. EGC는 모든 경우에서 상대 습도 81%에서 저장한 경우에 증가하였다. 감마선을 조사한 잎녹차에서는 진공상태로 저장한 경우에도 매우 높게 EGC가 증가하였다. 모든 조건에서 진공 상태에 저장한 결과, EGCG는 급격히 증가하였다. 그러나, 상대습도 81%에 저장한 경우에는 진공상태에 저장한 경우보다 매우 낮은 함량의 EGCG가 검출되었다. 카페인의 경우는 저장 후에 모든 조건에서 저장 초기보다 다소 증가하였다. 이상은 진공상태가 잎녹차 제품의 저장에 매우 중요함을 시사하였다.

V. 연구성과활용 계획

본 과제는 녹차제품의 관능적, 생리활성 기능성 품질을 유지하기 위해 다양한 저장 환경을 설정하고 그에 따른 품질을 분석하여 우수한 저장 환경을 발굴하고, 이를 통해 소비자들의 기호성에 맞는 제품을 생산 공급함으로써 녹차 생산 농가들의 소득 증대에 기여하는 것이 목표이다. 따라서 본 과제에서 연구 개발된 각종 정보 및 산업화 기술을 다양한 경로를 거쳐 관련 업계와 연계하여 홍보하고 산업화를 시도할 계획이다. 그 세부 내용은 다음과 같다.

1. 관련 업체에 대한 기술이전 및 자료 제공: 본 과제에는 햇차원이라는 녹차 가공 전문업체가 참여하고 있으므로 이 업체를 대상으로 본 과제에서 연구 개발된 각종 제품들에 대한 기술 이전 및 정보를 제공할 것이다.

2. 본 연구에서 확보한 연구결과는 타 과제와 통합 정리하여 필요 부분은 특허 출원할 계획이며, 관련 특허는 참여기업인 햇차원에 기술이전을 실시하

여 산업체에서 적극 활용할 수 있도록 지원한다. 또한 과제가 종료된 후에도 지역에 위치한 하동녹차연구소와 함께 지역 녹차 생산 농가 및 기업을 대상으로 연구결과에 대한 지속적인 교육·홍보 자료로 활용할 계획이다. 그리고 녹차의 고품질 산업화를 위해서는 기존 제품의 고부가가치화 및 제품 다양화 노력이 필요하다고 판단되므로, 과제를 통해 양성된 전문 인력 지원을 통한 산학연 network를 구축한다.

3. 논문 발표를 통한 홍보 : 본 과제에서 연구 개발된 정보를 논문 발표를 통해 홍보함으로써 일반 소비자들이 녹차 저장 조건에 대한 관심을 가지도록 유도한다. 특히 본 과제에서 집중적으로 연구된 우수한 저장 조건과 참여업체의 기술의 연계를 보도하게 하여 녹차 업계 차원에서 녹차 제품의 저장 조건에 관심을 갖도록 유도하여 웰빙 시대에 적합한 고품질의 녹차가 유통될 수 있게 한다.

SUMMARY

I. Title

Development of preservation technology for extending shelf-life of green tea with high quality

II. Objective and Significance

This study was performed to develop preservation technology for extending shelf-life of green tea with high quality. In order to achieve the goal, (1) Improve storage stability of green tea product and improvement for extraction of bioactive component, (2) Preparation and characterization of green tea extract, (3) Investigation for the diversity of physiological activities with storing conditions on green tea products, (4)

III. Contents and Scope

<Section 1>

1. Investigation of storage stability of green tea leaves and powder as a function of environmental condition.
2. Investigation of storage stability of green tea infusion as a function of environmental condition .
3. Effect of vacuum packaging on storage stability of green tea powder.
4. Establishment of process for produce of beverage using green tea power.
5. Establishment of manufacturing process and investigation of storage stability of green tea powder beverage.
6. Effect of gamma irradiation and infrared treatment on storage stability of green tea infusion.

7. Improvement of efficiency of extraction for bioactive component by ultra sonification–assisted process.
8. Establishment of optimum condition for extraction of green tea with high sensory property.

<Section 2>

1. Investigation of pximate component of roasted green tea
2. Investigation of contaminated microorganisms on the green tea leaves and green tea powder under the specific environmental storage condition
3. Confirmation of antimicrobial characteristics of green tea extract
4. Isolation and identification of antimicrobial substances
5. Safety test of green tea extract
6. Freshness evaluation of agricultural & fishery food materials and their processed foods treated with green tea extract

<Section 3>

1. Establishment of various storing conditions
2. Examination of the protective effect of green tea extracts with various storing conditions on PC12 cell line
3. Investigation of the protective effect of green tea extracts on A β –induced neurotoxicity
4. Investigation of the protective effect of green tea extracts on neuronal cell membrane damage
5. Confirmation of the antioxidant activities with storing conditions
6. Investigation of the inhibitory effect of green tea extracts on acetylcholine –sterase

<Section 4>

1. Establishment of analysis method for physiological components of green tea products
2. Evaluation of the effect of storage conditions (temperature, relative humidity, light, and air) on physiological components of green tea

products

3. Determination of storage methods (far-infrared treatment, gamma irradiation, vacuum packaging, and nitrogen packaging) on physiological components of green tea products
4. Analysis of physiological components of green tea depend on extraction conditions

IV. Major results and Recommendation

<Section 1>

1. Investigated that high relative humidity about 69, 81% unfavorable on storage of green tea product such as leaves and powder.
2. Total soluble matter and reducing power of green tea leaves was decrease significantly on 69, 81% of relative humidity.
3. Physical powder property as caking index of green tea powder stored at 81% of relative humidity was increased from 13% before storage to 84% after storage for 4 weeks.
4. Storage stability(on antioxidant activities, color values, appearance) of green tea infusion was most favorable in cold storage at 4°C among other conditions, such as, storage on ambient temperature, condition with presence air at ambient temperature and without light at ambient temperature, and storage at ambient temperature after added ascorbic acid. Lowest stability during storage did showed on condition with presence air at ambient temperature.
5. Catechins(such as, EGCg, EGC, ECg, EC, (+)-catechin) content on unfavorable condition as presence air at ambient temperature was decreased significantly. However, caffeine was increased significantly. This result from relationship between catechins and caffeine, because of, chemical structure of catechins unstable against environmental conditions.
6. We investigated effect of vacuum packaging on physico-chemical properties(such as, total soluble matter, color values, appearance, antioxidant activities and powder properties) unfavorable

condition(0.81 of water activity). On total soluble matter, color values, appearance and powder properties such as caking behavior and volume loss by tapping test, vacuum packaging did showed significant difference with control.

7. Physico-chemical properties of green tea powder when stored at 81% of relative humidity after vacuum packaging didn't show changes value. Consequently, vacuum packaging did showed potential to innovative method that intensive to environmental conditions for storage of green tea.
8. Efficiency of extraction for bioactive compounds such as total soluble matter, catechins, total phenol compound and free amino acids of green tea was improved by ultra sonification-assisted process.
9. Optimum extraction condition about ratio of total nitrogen to tannin(N/T value) was investigated by response surface methodology. Optimum condition of N/T value for extraction of green tea with high sensory property was 56~64°C of temperature and under 18 minute of time.

<Section 2>

1. Green tea extract(GTE) was prepared by utilizing the circulated hot-water extractor with high pressure. GTE showed antimicrobial effects remarkably against the wide spectrum of putrefactive and food spoilage microorganisms above 500µg/ml of concentration.
2. Their thermal and pH stability were effective under the range of temperature(40°C~150°C) and pH(3~11). Green tea extracts seemed to be a natural antimicrobial ideally with the view of their effectiveness and thermal & pH stability.
3. In the electron microscope experiment, their action mode suggested that their hydrophilic components would perturb the functions of microbial cell membranes synergistically. This result of cellular membrane permeability could be identified in the experiment that

o-nitrophenyl- β -galactopyranoside(ONPG), the artificial substrate of β -galactosidase, was hydrolyzed in the presence of GTE, indicating that microbial membranes were perturbed.

4. The isolation and identification of antimicrobial substances in GTE were carried out by using column chromatography and NMR, which proved to be (+)-catechin, (-)-catechin, (-)-epicatechin gallate and (-)-epigallocatechin gallate, isoeugenol, nomilin and β -sitosterol, respectively.
5. The acute oral LD₅₀ of GTE for rats was 5.95g/kg with 95% confidence limits. Patch application to the intact and abraded skin of rabbits led to mild to moderate erythema and no or mild edema.
6. In order to prepare the basic data for the development of natural food preservative to prevent food spoilage by contaminated microorganisms, the effects of green tea extract on the freshness maintainance of agricultural and marine produce were investigated. Most of foodstuffs treated in the 0.01%~0.05% of GTE solution showed to maintain their freshness for longer storage period and to decrease to less number of contaminated microorganisms than the control.

<Section 3>

1. To investigate the protective effect of green tea with various storing conditions on PC12 cell line, *in vitro* neuronal cell tests were performed. In our study, neuronal protective effects of green tea, along with water activity (0.813), and leaf storage periods (fresh leaf, or leaf stored for up to 4 weeks) were investigated.
2. In cell viability assays using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT), the fresh extract, and that obtained after 1 week of leaf storage, showed the best protective effects against A β -induced neurotoxicity.

3. LDH release into the medium was inhibited (by 20–25%) in all tests. In addition, all green tea extracts (fresh, or stored before extraction for up to 4 weeks) showed better cell protective effects ($93.3\pm 1.8\sim 96.2\pm 2.4$) than did vitamin C (91.0 ± 1.6), used as a positive control. The results suggest that effectiveness of green tea extracts falls with prolonged leaf storage.
4. we investigated the antioxidant activities of green tea with various storing conditions.
5. Our data show the dose–response curves for the reducing powers of the all extracts from green tea. It was found that the reducing powers of all the extracts also increased with the increase of their concentrations.
6. The reduction of radical scavenging activities of green tea hot water extracts were estimated by comparing the percentage inhibition of formation of DPPH radicals. It was found that the radical–scavenging activities of various green tea extract increased with increasing concentration.
7. In FRAP assay, similar to the results obtained from the reducing power and DPPH radical scavenging assay, green tea hot water extract showed dose–dependent ferric ion–reducing activity.
8. Consequently, in these storing conditions, the difference of each temperature and water activity was not contributed to antioxidant activity. Only, the condition of green tea for extraction of physiological substances including catechins is very important. In this view point, this study strongly suggested that the powdered green tea is more useful.
9. In order to find the acetylcholinesterase inhibitory (AChEi) effect of green tea with various storing conditions, *in vitro* tests were performed.
10. Enzymatic assay on acetylcholinesterase was performed under same condition compared to the antioxidant methods. PC12 cell homogenates were used as enzyme sources of acetylcholinesterase (AChE). In these experiments, each concentration of samples was 100,

500, and 1,000 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

11. Among them, the highest concentration (1,000 $\mu\text{g/mL}$) of fresh sample extracts showed most potent inhibitory effect on AChE by more than 40%, and concentration –dependent pattern. In addition, we examined the effect of other storing conditions on AChE inhibition.
12. For 3 months storage, storing condition was temperature (room temperature, 4°C, and –20°C) and water activity (0.81, 0.69, and 0.23). In this storing condition, the difference of each temperature was not contributed to AChE inhibitory effect. Our data presented that the AChE inhibitory effect was affected by the concentration of green tea extract and water activity (0.81).

<Section 4>

1. After storing green tea powder for three months at three different temperatures (–20, 4, and 20°C) with three different relative humidities (RHs) (23, 69, and 81%), the chemical quality was evaluated with green tea, which was prepared by soaking 1.5 g of the powder into 100 mL of distilled water at 70°C for 5 min.
2. Total phenolic contents, total flavanol contents, and ascorbic acid contents of green tea powder stored at 4°C with 23% RH changed from 267.5, 49.4, and 24.2 mg/g to 287.1, 44.9, and 36.9 mg/g, respectively, compared to the powder before storage.
3. EGC and EGCG, the main catechins of green tea, also changed from 16.9 and 27.3 mg/g to 24.3 and 36.5 ,g/g, respectively, after storage for 3 months at 4°C with 23% RH.
4. However, when the green tea powder was stored at –20 or 20°C with higher RH such as 69 and 81% significantly decreased the chemical compounds.
5. The results indicate that temperature and RH are important during storage of green tea powder, and low RH and refrigerated condition (–4°C) are preferred to increase or preserve the chemical compounds of the tea.
6. After preparing green tea, it was stored at three different conditions

- (A) green tea was stored at not–artificially excluding natural light condition, at natural air condition, and without addition of vitamin C; (B) green tea was stored at artificially excluding natural light condition by wrapping a vial with aluminium foil, at nitrogen filling up condition, and with addition of 30 mg/100 mL of vitamin C; and (C) green tea was stored at artificially excluding natural light condition by wrapping a vial with aluminium foil, at nitrogen filling up condition, and without addition of vitamin C.
7. After 28 days of storage at 4°C, the chemical quality of the green tea was evaluated. Total phenolic contents of (A), (B), and (C) green tea decreased to 71.50, 73.88 and 75.07%, respectively, after storing for 28 days compared to those of beginning state.
 8. DPPH radical scavenging activities of (A), (B), and (C) green tea were 87.87, 92.93 and 88.39%, respectively. Epigallocatechin gallate (EGCG), the main active compounds of green tea, contents of (A), (B), and (C) green tea were 130.61, 136.47 and 4.34%, respectively.
 9. The results indicated that light, air condition, and vitamin C were significantly important to the chemical quality of green tea during storage.
 10. The effects of far–infrared (FI), gamma irradiation (GI) on the green tea during storage were also investigated. FI green tea treated at 90°C for 10 min, GI green tea irradiated with 5 kGy, and non–treated control green tea were stored for 3 months in vacuum or in 81% RH.
 11. Total phenolic contents of control green tea increased in which stored in vacuo, while decreased in 81% RH after 3 months. Green teas stored in vacuo showed higher total flavanol contents and EGCG than stored in 81% RH.
 12. The results suggested that storing in vacuo was very important for functional components.

CONTENTS

Chapter 1	Introduction of the Research Project	26
Section 1	Research Aims and Necessities	26
Section 2	Range of the Research Development	30
Chapter 2	Research Trend in Korea and Overseas	31
Chapter 3	Research Constituents and Results	33
Section 1.	Establishment of plan for improve storage stability of green tea product and improvement for extraction of bioactive component	33
1.	Research Contents	33
A.	Investigation of storage stability of green tea leaves and powder as a function of environmental condition	33
B.	Investigation of storage stability of green tea infusion as a function of environmental condition	34
C.	Improvement of storage stability of green tea powder by vacuum packaging.....	35
D.	Establishment of process for produce and investigation of storage stability of beverage using green tea powder	37
E.	Effect of gamma irradiation and infrared treatment on storage stability of green tea infusion	38
F.	Improvement of efficiency of extraction for bioactive component by ultrasonification-assisted process	38
G.	Establishment of optimum condition for extraction of green tea with high sensory property	41
2.	Results	42
A.	Storage stability of green tea leaves and powder as a function of environmental condition	42
B.	Storage stability of green tea infusion as a function of environmental condition	53

C. Improvement of storage stability of green tea powder by vacuum packaging	60
D. Establishment of process for produce and investigation of storage stability of beverage using green tea power	6
E. Effect of gamma irradiation and infrared treatment on storage stability of green tea infusion	74
F. Improvement of efficiency of extraction for bioactive component by ultra sonification-assisted process	77
G. Establishment of optimum condition for extraction of green tea with high sensory property	8

Section 2 Preparation and characterization of green tea extract

.....	91
1. Research Contents	9
A. Preparation of green tea sample	9
B. Approximate component analysis of green tea sample	9
C. Analysis of microorganisms contaminated on green tea as a funtion of environmental condition	91
D. Antimicrobial test of green tea extract	9
E. Effect of green tea extract on the function of microbial cytoplasmic membrane	94
F. Isolation and identification of antimicrobial substances	9
G. Safety test of green tea extract	9
H. Freshness evaluation of agricultural & fishery food materials and their processed foods treated with green tea extract	9
2. Results	99
A. Approximate components of green tea sample	99
B. Change of microorganisms contaminated on green tea as a funtion of environmental condition	100
C. Preparation and antimicrobial characteristics of green tea extract	13
D. Inhibitory effect of green tea extract on the growth of pathogenic and putrefactive microorganisms	108

E. Thermal and pH stability of green tea extract	109
F. Effect of green tea extract on the physiological function of microorganisms	112
G. Isolation and identification of antimicrobial substances	116
H. Safety test of green tea extract	128
I. Freshness evaluation of agricultural & fishery food materials and their processed foods treated with green tea extract	130
Section 3 Investigation for the diversity of physiological activities with storing conditions on green tea products	139
1. Research content	139
A. Green tea storing conditions and methods	139
B. Preparation of green tea extracts	139
C. Incubation of neuronal cell	139
D. Protective effect of green tea extracts on A β -induced neurotoxicity	141
E. Protective effect of green tea extracts on neuronal cell membrane damage	141
F. Diversity of Antioxidant activities with storing conditions	141
G. Inhibitory effect of green tea extracts on acetylcholinesterase	141
2. Results	144
A. Protective effect of green tea extracts on A β -induced neurotoxicity	144
B. Protective effect of green tea extracts on neuronal cell membrane damage	146
C. Diversity of Antioxidant activities with storing conditions	151
D. Inhibitory effect of green tea extracts on acetylcholinesterase	151
Section 4. Effect of storage conditions on physiochemical properties of green tea products	177
1. Research Contents	177
A. Preparation of green tea extract	177
B. Total phenolic contents	177

C. Total flavanolic contents	177
D. Ascorbic acid contents	178
E. Analysis of catechins	178
F. Color analysis	178
G. Radical scavenging activity	178
H. Statistical analysis	181
2. Results	181
A. Effect of storage conditions of green tea leaves on physicochemical properties of green tea extract	182
B. Effect of storage conditions of green tea powders on physicochemical properties of green tea extract	190
C. Effect of storage conditions of green tea beverages on physicochemical properties of green tea extract	198
D. Effect of storage methods (far-infrared, gamma irradiation, vacuum, and relative humidity) of green tea beverages on physicochemical properties	203
Chapter 4 Aims Achievement and Contribution to Related Fields ...	207
Section 1. Achievement	207
Section 2. Contribution to related Fields	210
Chapter 5 Application Plan of the Research Products	213
Chapter 6 Acquired Scientific Informations	215
Chapter 7 References	218

목 차

제1장 연구개발과제의 개요	26
제1절 연구개발의 목적 및 필요성	26
제2절 연구개발의 범위	30
제2장 국내외 기술개발 현황	31
제3장 연구개발수행 내용 및 결과	33
제1절 녹차제품(잎, 분말, 음료)의 저장안정성 개선방안 구축 및 녹차유용물질의 추출법 개선	
1. 연구개발 수행 내용	33
가. 저장환경에 따른 녹차엽과 분말의 저장 안정성 분석	33
나. 저장환경에 따른 녹차 침출액의 저장 안정성 분석	34
다. 진공포장에 의한 녹차분말의 저장 안정성 개선	35
라. 녹차 분말음료의 제조 공정 확립 및 저장안정성 분석	37
마. 감마선 및 원적외선 처리에 따른 녹차 침출액의 저장 안정성 분석	38
바. 초음파 추출법을 통한 녹차 유용성분의 추출효율 개선	39
사. 고기호성 녹차 음료 제조를 위한 최적 추출조건 확립	41
2. 연구개발 수행 결과	42
가. 저장환경에 따른 녹차엽과 분말의 저장 안정성	42
나. 저장환경에 따른 녹차 침출액의 저장 안정성	53
다. 진공포장에 의한 녹차분말의 저장 안정성 개선	60
라. 녹차 분말음료의 제조 공정 확립 및 저장안정성 분석	69
마. 감마선 및 원적외선 처리에 따른 녹차 침출액의 저장 안정성	74
바. 초음파 추출법을 통한 녹차 유용성분의 추출효율 개선	77
사. 고기호성 녹차 음료 제조를 위한 최적 추출조건 확립	87
제2절 녹차추출물의 항균물질 조제 및 항균작용 구명	91
1. 연구개발 수행 내용	91
가. 녹차시료의 조제	91
나. 녹차시료의 일반성분 분석	91
다. 저장환경별 녹차시료의 오염미생물의 측정	91

라. 녹차추출물의 항균력 검사	98
마. 미생물 세포막의 기능성에 미치는 녹차추출물의 영향	94
바. 항균활성물질의 분리 및 동정	95
사. 녹차추출물의 안전성 검사	95
아. 농축수산 식품소재 및 가공식품에 대한 녹차추출물의 처리효과	98
2. 연구개발 수행 결과	99
가. 녹차시료의 일반성분	99
나. 저장환경별 녹차시료의 오염미생물의 변화	100
다. 녹차추출물의 조제 및 항균특성	103
라. 녹차추출물의 미생물 생육저해 농도곡선	108
마. 항균물질의 열 및 pH 안정성	109
바. 녹차추출물이 미생물의 생리적 특성에 미치는 영향	112
사. 항균활성 물질의 분리 및 동정	116
아. 녹차추출물의 안전성 검사	128
자. 농축수산 식품소재 및 가공식품에 대한 녹차추출물의 처리효과	130

제3절 저장 방법에 따른 녹차제품의 생리활성능 (뇌신경질환) 변화조사..... 139

1. 연구개발 수행 내용	139
가. 녹차저장조건 및 방법	139
나. 녹차추출액 제조	139
다. 신경세포 배양	139
라. 신경세포사멸에 대한 보호 효과 측정 (A β -induced neurotoxicity에 대한 보호 효과)	140
마. 신경세포 막 손상에 대한 보호 효과 측정	141
바. 저장 조건에 따른 항산화 효과 변화 측정	141
사. 뇌신경전달물질 (acetylcholine) 분해효소 (acetylcholinesterase)에 대한 저해효과 측정	142
2. 연구개발 수행 결과	144
가. 신경세포사멸에 대한 보호 효과 측정 (A β -induced neurotoxicity에 대한 보호 효과)	144
나. 신경세포 막 손상에 대한 보호 효과 측정	146
다. 저장 조건에 따른 항산화 효과 변화 측정	151

라. 뇌신경전달물질 (acetylcholine) 분해효소 (acetylcholinesterase)에 대한 저해효과 측정	165
--	-----

제4절 저장환경이 녹차제품의 생리활성 성분에 미치는 영향 177

1. 연구개발 수행 내용	177
가. 녹차 제조	177
나. 총 페놀 함량	177
다. 총 플라바놀 함량	177
라. 아스코르브산 함량	178
마. 카테킨류 분석	178
바. 색도 측정	178
사. 라디칼 소거능 측정	178
아. 통계 처리	181
2. 연구개발 수행 결과	181
가. 잎녹차의 저장 환경이 생리활성에 미치는 영향	182
(1) 잎녹차의 저장 환경이 라디칼 소거능에 미치는 영향	182
(2) 잎녹차의 저장 환경이 환원력에 미치는 영향	182
(3) 잎녹차의 저장 환경이 아질산 소거능에 미치는 영향	183
(4) 잎녹차의 저장 환경이 총 페놀 함량과 총 플라바놀 함량에 미치는 영향	184
(5) 잎녹차의 저장 환경이 카테킨류 함량에 미치는 영향	187
(6) 잎녹차의 저장 환경이 녹차의 색도에 미치는 영향	187
나. 분말 녹차의 저장 환경이 생리활성에 미치는 영향	190
(1) 분말녹차의 저장 환경이 총 페놀 함량에 미치는 영향	190
(2) 분말녹차의 저장 환경이 총 플라바놀 함량에 미치는 영향	190
(3) 분말녹차의 저장 환경이 아스코르브산 함량에 미치는 영향	191
(4) 잎녹차의 저장 환경이 총 페놀 함량과 총 플라바놀 함량에 미치는 영향	194
다. 저장 조건이 녹차 음료의 품질에 미치는 영향	198
(1) 총 페놀 함량과 총 플라바놀 함량의 변화	199
(2) DPPH 라디칼 소거능의 변화	199
(3) 카테킨류 함량의 변화	201

(4) 카페인 함량의 변화	201
라. 저장 방법(원적외선 및 감마선 조사, 진공 및 상대습도 포장)이 생리활성에 미치는 영향	203
(1) 저장 방법이 총 페놀 함량과 총 플라바놀 함량에 미치는 영향	208
(2) 저장 방법이 EGC, EGCG 및 카페인 함량에 미치는 영향	208
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	207
제1절 연구개발 목표의 달성도	207
제2절 관련 분야 기술 발전에의 기여도	210
제5장 연구개발 성과 및 성과 활용계획	213
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	215
제7장 참고문헌	218

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적, 필요성 및 범위

1) 기술적 측면

○ 차는 전 세계적으로 물 다음으로 가장 많이 소비되는 기호음료로서 최근 차의 건강기능적 우수성이 과학적으로 입증됨에 따라 꾸준한 차산업의 신장과 더불어 마시는 차음료 뿐 아니라 면류, 아이스크림 등의 가공식품에 녹차를 첨가하는 등 먹는 녹차의 형태로 식품에서의 그 활용도가 확대되고 있음. 또한, 녹차 유래 유용성분들의 생리학적 기능이 과학적으로 부각됨에 따라 이들 성분을 이용한 화장품 및 의약품으로 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있음.

○ 녹차의 소비신장과 수요증가에 힘입어 국내의 차 재배면적과 생산량은 꾸준히 증가하고 이를 통한 농가수입 증대가 이루어져 왔으나, 최근 FTA발효에 따라 중국과 베트남 등의 외국의 값싼차 유입에 따른 국내 차재배농가의 불안감 증가와 국내 차산업의 위축과 국제경쟁력 약화가 예상되고 있음.

○ 이를 극복하기 위한 방안으로 외국산 녹차에 비해 우수한 기호적 특징과 생리학적 기능성을 갖는 성분을 다량 함유하는 녹차재배 및 그 재배기술의 농가 보급, 차잎의 특성을 고려한 표준화된 제다법 및 다양한 가공기술을 접목한 고품질의 녹차 및 녹차가공품 생산, 그리고 녹차제품의 유형별 최적저장기술 확보를 통한 제품의 품질관리 및 안전한 유통관리 등을 포함한 종합적이고 체계적인 대책이 절실히 요구되고 있음

○ 현재 이와 관련된 국내의 녹차연구는 국내산 녹차품종의 성분분석과 생리학적 기능, 전통제다 방법에 따른 성분변화에 관한 연구 등 주로 녹차 성분의 생리 기능적인 측면과 녹차의 가공 방법에 대해 주로 진행되어 왔으나, 녹차의 가공 후 보존 및 저장 방법에 대한 연구는 거의 없는 실정임.

○ 본 연구사업의 참여업체인 햇차원은 고품질 녹차의 재배 및 제다기술을 확보하여 국내 고품질 수제차 및 그 가공품의 제조에 있어 선구자적 역할을 하고 있으나, 제조 후 저장기술의 미확보에 기인한 녹차제품의 품질열화 문제점을 지적하고 있으며 그 해결방안을 찾기 위해 유기적인 산학연계시스템 구축과 공동연구의 필요성을 절실히 인식하고 있음.

○ 녹차 제품을 유형별로 구분하면 잎녹차, 티백녹차, 녹차 함유 가공식품의 원료인 분말녹차, 간편히 음용될 수 있는 녹차음료, 그리고 녹차추출물 함유 화장품 및 의약품 등이 있음.

- 녹차 잎이나 분말녹차는 일종의 건조식품으로 제조 가공시 보존성을 고려하여 수분 함유량을 아주 낮게 건조시킴으로써 일반 식품에 비해 보존성이 긴 편이다. 그러나 차 잎에 존재하는 산화효소의 활성여부와 저장환경에 따라 단시간 내에 쉽게 변질되어 차 잎의 색깔과 향미가 나빠져 상품적인 가치가 떨어짐. 특히 녹차 잎은 일년에 생산되는 시기가 한정되어 있으나 사시사철 소비되고 있어 녹차 잎의 저장에 대한 연구가 절실히 요구되고 있음

- 소비자의 식품의 편의성과 간편성에 대한 선호도가 증가함에 따라 최근 녹차 음료의 생산업체 수와 매출신장이 점차 확대되고 있으나 녹차의 기호적 특성과 생리학적 기능에 과학적으로 근거한 고품질의 녹차 음료개발에 대한 연구는 아직 미미한 실정임. 또한, 녹차 음료의 저장성 개선을 위한 연구는 산발적으로 보고되고 있으나 가용성 유용성분의 변화방지와 생리학적 기능유지를 위한 보다 체계적인 저장기술 보급이 필요한 실정임.

- 본 과제에서는 녹차제품을 유형별(잎녹차, 분말녹차, 녹차음료)로 저장환경(온도, 상대습도, 빛, 공기)에 따른 저장특성을 규명하고 녹차제품의 선도유지를 향상시킬 있는 방안(원적외선조사, 감마선조사, 초음파처리, 포장방법 등)을 제시하고 분석하여 녹차제품의 유형별 최적저장기술을 확립하고자 함.

2) 경제·산업적 측면

- 소득증대와 더불어 녹차가 건강식품으로 인식됨에 따라 '91이후 매년 13% 내외의 높은 성장을 지속하고 있으며 녹차를 이용한 다양한 가공품 개발과 농촌 어메니티(amenity) 자원으로 관광 상품화가 용이하여 지역경제 활성화에 기여도가 높음.

- ☞ 경제성(소득) : 쌀 715천원 ⇒ 차 2,250천원/10a

- ☞ 경제유발효과 : 생엽조수입의 9배

- ▶ 수제차 수확 및 가공산업의 고용증대

- ▶ 차관련 산업의 발전촉진 : 다기, 가공식품 등

- 국내 녹차 생산량은 2002년 건엽기준으로 연간 약 1,500 톤이 생산되고 있으며, 금액으로는 500억원에 이른다. 근래 웰빙식품의 기호도 급신장과 녹차의 건강기능적 효능이 알려지면서 녹차 시장은 매년 40-50% 급신장하고 있으나, 2003년 유엔식량농업기구(FAO)의 통계조사에 의하면 1인당 차 소비량은 영국 3000g, 기타 유럽 1000g, 일본 1550g, 중국 360g, 한국 40g으로, 아직 일본의 1/40, 중국의 1/9수준에 불과해 국내의 차 산업의 성장 가능성은 매우 큰 것으로 전망됨.

- 국내 1인당 차 소비현황 및 전망('2002년 농촌경제연구원)

총소비량(톤)	3,469	3,854	4,274	4,732	5,232	5,777	6,370	7,015	7,717	8,479
1인당소비량(g)	72	79	87	96	106	116	126	140	154	169
연 도	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014

○ 그동안 녹차는 티백 형태로 많이 소비되었으나 근래에는 패트병에 액상 형태로 추출하여 판매되는 형태가 늘고 있다. 한편, 고급 수제차의 경우에도 고소득층 위주로 판매되었으나 웰빙 식품에 대한 기호도가 급신장하면서 이에 대한 시장도 급속히 성장하고 있음.

○ 지금까지, 고품질의 녹차가 생산되는 시기는 첫 녹차를 수확하는 시기로 한정되어 있어, 최근 급격히 증가하고 있는 녹차의 생산 현황으로 볼 때, 곧 고급 녹차의 생산이 소비를 초과 할 것으로 예상되며, 최근 그러한 증후가 녹차 재배 및 생산 농가를 중심으로 급격히 확산되고 있음. 전통적인 방법으로 생산되어 지는 고급 녹차의 공급을 저장방법의 개선으로 연중 안정적으로 공급하고, 그에 따른 가격 경쟁 및 세계 시장에서의 경쟁력을 확보 하고자 함.

3) 사회·문화적 측면

○ 녹차 및 녹차 가공품은 우리나라에서도 근래 다원이 확보되어 크게 신장될 품목이지만, 일본 등에 밀려 그 동안 기술개발 노력 부족과 중국의 기술향상으로 시장성장에 한계가 있는 것으로 인식되어 왔다. 이를 타개하기 위하여서는 우수한 차잎을 원료로 하여, 값이 저렴하고 편이성이 강조된 가공제품을 개발하여 보급할 수 있는 기술 개발이 시급하다.

○ 즉, 녹차의 건강 기능효능을 십분 발휘하기 위해서는 약리효능 성분의 추출이 단시간내에 이를 수 있는 전처리 개발과 전처리에 의하여 추출효율이 증가할 뿐 아니라 전처리 녹차를 원료로 하여 제조된 녹차 가공소재의 약리효능을 과학적이고 체계적으로 입증하는 일이 필요하다고 생각된다.

○ WTO 체제의 급속한 진전과 FTA영향으로 인한 한국 농업 미래에 대한 불안감이 고조 되고 있는 현실에서, 일본을 비롯한 여러 국가와의 경쟁력에서 한국 녹차의 위상을 세우기 위한 방안으로, 고급 녹차의 우수성을 입증하고, 그에 걸맞는 가공 및 유통 경로의 확보가 절실히 필요한 시점에 고급녹차의 특성을 파악하고, 하급녹차와의 기능성 차이를 밝혀, 그 기능성을 최대한 유지 할 수 있는 저장방법의 개발은 급속한 성장을 보이고 있는 세계 녹차 시장에서 우리의 녹차가 우위를 점할 수 있는 발판이 될 수 있을 것이다.

이상에서 언급한 바와 같이 녹차는 중국을 필두로 하여 한국, 일본, 인도, 싱가포르 등의 아시아 지역 및 유럽 선진국가를 비롯하여 세계적인 특성화 공동체 산물로 문화적, 정신적, 기능적인 면에서 이 지역민의 식생활 속에 깊이 파고 들어 상식해오고 있는 건강식품이다. 그러나 보호차원의 사회패턴 속에서 비과학적인 전통의학관에 머물러 있으면서 녹차의 기능성을 확인하고 가공식품을 개발하는 노력이 부족한 형편이다. 이제 농산물 개방 시대를 맞아 농업의 전환점에서 녹차의 재배방식, 기능성 확인, 가공품 개발에 대한 산농관학간의 기술적인 공동연구가 절실히 요구되고 있다.

제 2 절 연구개발의 범위

- 녹차제품의 저장안정성 개선방안 구축 및 녹차유효물질의 추출법 개선
 - 저장환경에 따른 제품유형별 녹차시료 제조
 - 녹차 침출액의 저장성 향상을 위한 방안 강구
 - 분말녹차의 저장환경에 따른 흡습특성 및 안정성 규명
 - 녹차 제품의 저장성 향상을 위한 방안 구축
 - 초음파처리, 원적외선조사, 포장기술개발 등
 - 추출공정 개선을 통한 유효물질의 추출효율 최적화
- 녹차제품의 미생물 오염 특성조사 및 녹차성분의 항균작용 규명
 - 녹차제품(잎차, 분말, 침출액)의 저장 중 미생물 오염 특성 조사
 - 녹차추출물의 항균 작용구명
 - 저장환경에 따른 항균력의 변화 조사
 - 녹차의 항균물질 분리 및 특성구명
 - 녹차추출물을 첨가한 농수축산물 및 그 가공품에 대한 항균 기능성
- 저장 방법에 따른 녹차 제품의 생리활성능(뇌신경질환) 변화조사
 - 녹차제품의 퇴행성뇌신경 질환에 대한 효과 조사
 - 저장 환경에 따른 뇌신경세포 보호효과 변화
 - 저장 환경에 따른 신호전달물질로서의 acetylcholine 분해효소 저해능 변화 측정
- 녹차제품의 저장에 따른 생리활성물질 변화조사
 - 녹차가공품의 생리 활성 물질 측정법 확립
 - 녹차의 저장환경(온도, 상대습도, 광선, 공기)이 녹차가공품의 생리활성물질에 미치는 영향조사
 - 녹차의 저장방법(원적외선 및 감마선 조사, 진공 및 질소충전 포장)이 녹차가공품의 생리활성물질에 미치는 영향조사
 - 추출방법 및 조선에 따른 생리활성물질의 함량 분석

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 차의 화학구성성분은 카테킨, 카페인, 단백질, 아미노산, 섬유소, 펙틴 등과 플라보놀 유도체, 안토시안 등의 식물색소 그리고 지질, 정유, 비타민, 무기질 등이며, 이들 화학성분의 조성은 차품종, 재배방법, 채엽시기, 가공방법 등에 의해 차이가 나며 차제품의 기호도에도 많은 영향이 있음이 알려져 있음.

- 현재까지 녹차 유래 유용물질들의 생리학적 기능 및 그 화학적 구조에 대해서는 국내외적으로 무수히 많은 연구가 진행되고 보고되고 있음. 대표적인 녹차 및 녹차추출물들의 생리활성 기능은 항산화, 항암, 항균 기능, 심혈관 질환 예방, 면역성 증진, 충치예방, 다이어트, 피부미용효과, 심신안정 및 두뇌활성 등이 알려지고 있음.

- 하지만, 녹차의 성분들은 화학구조상 온도와 수분, 산화효소 등에 불안정한 성분(예, 카테킨류) 들을 다량 함유하고 있어 제조과정이나 저장 중에 성분변화가 예상되나 이와 관련된 연구는 상대적으로 매우 미미한 실정임.

- 현재 알려진 녹차의 저장 중 품질의 변화 기작은 처음에는 향기 성분과 같은 저비점 물질의 휘발에 의해 향기의 손실이 일어나고, 중기에는 폴리페놀이나 색소 성분들의 산화에 의해 맛과 색깔의 변질이 일어나며, 후기에는 이러한 산화 생성물의 축적에 의해 상품의 품질적인 손상으로 상품적인 가치도 떨어지는 것으로 알려짐.

- 차의 녹색을 나타내는 주요 화학 성분은 엽록소인데 이 성분은 산의 생성과 엽록소 효소에 의해 분해되어 갈색 페오포르비드(pheophorbide)가 만들어지고 마그네슘 이온이 유리되어 흑색을 나타내는 페오피틴(pheophytin) 성분으로 변하게 된다. 차의 저장 과정 중 일어나는 엽록소 변화의 주요인은 엽록소 구조 중의 마그네슘이 유리되는 현상으로 약 40%까지 유리될 경우 그런데로 좋은 편이지만 70% 이상 변화될 때에는 차의 색이 현저하게 떨어지게 된다.

- 차의 떫은 맛과 차탕의 색상에 가장 큰 영향을 미치는 폴리페놀 성분은 원래 무색 화합물이지만 쉽게 산화되어 갈색을 띠게 된다. 녹차 잎을 수분이 많은 곳에 장기간 보관하였을 때 폴리페놀 성분과 공기 중의 산소가 접촉하여 산화 작용이 일어나 광택이 손실되고 선록색에서 어두운 갈색으로 변하여 수렴성이 감소되고 맛이 담백해진다. 또한 잎을 우려냈을 때 수색이 갈색을 띠며 맛이 없어진다.

○ 차잎 중에는 소량의 리놀렌산 등의 불포화 지방산이 함유되어 있어 자동 산화에 의해 알데히드나 케톤, 알콜 등의 물질이 생성되어 좋지 않은 냄새를 내게 되고 제품의 변질을 가져오게 된다. 이외에 카로테노이드와 같은 색소 성분도 쉽게 산화되어 향미의 저하를 가져온다.

○ 저장 중의 차잎의 변질과 비타민 C의 함량은 매우 밀접한 관계가 있다. 비타민C 잔존률이 80% 이상일 경우 품질이 매우 좋지만 60% 이하일 때는 차 잎이 이미 상당히 변해 있다고 볼 수 있다. 비타민 C의 산화 초기에는 다른 성분의 변화를 어느 정도 막지만 얼마간 경과되면 도리어 비타민 C의 산화 생성물이 갈변의 원인이 함.

○ 이와 같이 차의 변질에 영향을 주는 요소에는 수분, 온도, 산소, 광선, 이취 등의 외적 요인과 잔존 효소와 같은 내적 요인이 있는데 이러한 요소들을 잘 조절하고 여러 저장기법(감마선조사, 원적외선처리, 포장 등)의 접목함으로써 차의 품질을 오래 유지시킬 수 있는 저장기술을 확립할 수 있음.

이러한 연구 결과는 식물체에 공유결합되어 있는 폴리페놀성 기능성 물질이 다양한 전처리에 의해 유리되며, 이로 인해 식물 고유의 생리활성 기능이 향상될 수 있음을 의미한다. 원적외선을 비롯한 열처리 방법은 물질 표면에 성분의 손실없이 내부에 직접 열을 이동시켜 이들 저분자 물질의 유리 활성화시키기 위한 최적의 가공 방법일 것으로 판단되며, 이를 통하여 우리나라에서 다량으로 발생하는 녹차 가공 부산물을 향산화성 물질 소재로 이용함으로써 미활용 소재의 이용률을 높이며, 천연물의 새로운 가공 방법을 개발할 것이다.

녹차가공품으로는 호상요구르트, 기능성 음료, 식초, 차, 술, 두부, 제빵, 고추장, 찜, 된장, 찜장, 찜아치, 김치, fruit leather 등 녹차추출물을 가한 가공식품이 산발적으로 연구되거나 생산, 판매되고 있으나 가공산업의 위치를 확보하기 어려운 입장에 처해 있다. 현재까지의 녹차가공 식품은 주류와 음료가 대표적이며, 이들은 녹차를 추출하는 형태로 이용하고 있다. 이 경우에는 부산물이 발생하게 되며, 추출율에 따라서 경제성도 차이가 나게 된다. 따라서 녹차를 추출물 형태로 이용할 경우에도 추출 효율을 증대시킴으로써 부산물의 발생을 줄일 수 있을 것이다. 또한 녹차를 건조하여 분말형태로 만들어서 보다 다양한 형태의 식품 개발에 사용한다면 부산물의 발생을 현저하게 줄일 수 있을 것이다. 앞으로의 식생활은 전통적인 방식과 서구적인 방식의 식생활이 혼재된 양상으로 나타날 것으로 생각되므로 녹차의 기능성을 활용한다는 의미에서 전통 식품이나 서구적인 제품류에 녹차 추출물이나 분말을 첨가함으로써 기능성 제품을 만들고자 하는 의도가 필요한 입장이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 녹차제품(잎, 분말, 음료)의 저장안정성 개선 방안 구축 및 녹차유용물질의 추출법 개선

1. 연구개발 수행 내용

가. 저장환경에 따른 녹차엽과 분말의 저장 안정성 분석

(1) 총 가용성 고형분 함량

Aluminum weighing dish에 침출액 30ml를 취해 105°C에서 상압 가열법에 의해 항량에 이를 때까지 건조한 후 건조전과 건조후의 중량차이를 이용해 총 가용성 고형분 함량을 구하였다.

(2) 색도

녹차침출액의 색도측정은 각 침출액을 방냉 시킨 후 여과지(Whatman No. 2)로 여과시킨 후 색차계 (Minolta, Chromameter CR-310)를 사용하여 L(lightness), a(redness), b(yellowness)값을 측정하였으며 Hunter 식으로 색차(ΔE)를 계산하였다. 이때 표준 증류수의 값으로 L은 100, a는 -0.01, b는 0.03이었다(Bosch et al., 2007).

(3) 외관

저장기간에 따른 녹차엽과 분말의 외관의 변화를 사진 촬영하여 관찰하였다.

(4) 항산화 활성 측정

(가) DPPH radical scavenging activity

녹차침출액의 DPPH radical 소거활성은 침출액 0.1 mL에 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 메탄올 용액(4 mg/100 mL) 4 mL씩을 vortex로 균일하게 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 UV/Vis-spectrophotometer(Shimadzu Co., Japan)로 측정하였다. 각 시료를 3회 반복실험을 실시하여 평균하였다(Braca et al., 2002).

(나) Reducing power

시료 2.5 mL에 sodium phosphate buffer(2.5 mL, 200 mM, pH 6.6)와 1% potassium ferricyanide(2.5 mL)를 혼합시킨 후 혼합물을 50°C에서

20분 동안 incubation 시킨 다음 trichloroacetic acid(2.5 mL, 10%, w/v)를 첨가하여 650 × g에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 한 상정액(5 mL)에 탈이온수(5 mL)와 1% ferric chloride 1 mL를 첨가시킨 후 UV-spectrophotometer를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다(Oyaizu, 1986).

(5) 녹차분말의 물리적 특성

(가) Caking behavior

Caking behavior는 Nijdam et al., 2006의 방법을 변형하여 측정하였다. 먼저 분말을 250 μ m sieve를 통해 통과시킨 후 20 $^{\circ}$ C의 온도에서 수분활성도가 0~0.93로 일정하게 유지된 데시케이터에 1.5g씩 넣고 4주동안 저장하는 동안 각각의 샘플을 250 μ m sieve를 통해 통과한 분말의 중량(g)을 상대습도 20%에서 측정하였다.

$$C = \frac{M_T - M_F}{M_T} \times 100$$

C: caking index(%)

M_T: the total mass of sample(g)

M_F: the mass of fines that passed through the sieve(g)

(나) Tapping test에 따른 분말의 부피감소율 측정

Tapping test는 Abdel et al., 1975과 El-Tinay et al., 1985의 방법을 변형하여 측정하였다. 20 $^{\circ}$ C의 온도에서 수분활성도가 0~0.81로 일정하게 유지된 각각의 분말샘플을 50 mL graduated cylinder에 넣고 120 mm의 높이에서 부피변화가 없을 때까지 자유낙하(tapping)시키는 횟수마다 부피를 측정하여 그 변화량을 계산하였다.

나. 저장환경에 따른 녹차 침출액의 저장안정성 분석

(1) 항산화 활성 측정

(가) DPPH radical scavenging activity

녹차침출액의 DPPH radical 소거활성은 침출액 0.1 mL에 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 메탄올 용액(4 mg/100 mL) 4 mL씩을 vortex로 균일하게 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 UV/Vis-spectrophotometer(Shimadzu Co., Japan)로 측정하였다. 각 시료를 3회 반복실험을 실시하여 평균하였다.

(나) Reducing power

시료 2.5 mL에 sodium phosphate buffer(2.5 mL, 200 mM, pH 6.6)와 1% potassium ferricyanide(2.5 mL)를 혼합시킨 후 혼합물을 50°C에서 20분 동안 incubation 시킨 다음 trichloroacetic acid(2.5 mL, 10%, w/v)를 첨가하여 650 × g에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 한 상정액 (5 mL)에 탈이온수(5 mL)와 1% ferric chloride 1 mL를 첨가시킨 후 UV-spectrophotometer를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 색도

녹차침출액의 색도측정은 각 침출액을 방냉 시킨 후 여과지 (Whatman No. 2)로 여과시킨 후 색차계 (Minolta, Chromameter CR-310)를 사용하여 L(lightness), a(redness), b(yellowness)값을 측정하였으며 Hunter 식으로 색차(ΔE)를 계산하였다. 이때 표준 증류수의 값으로 L은 100, a는 -0.01, b는 0.03이었다.

(3) 외관

저장기간에 따른 녹차엽과 분말의 외관의 변화를 사진 촬영하여 관찰하였다.

(4) Catechin류 및 caffeine 함량 측정

Catechin류와 caffeine의 함량은 HPLC (Agilent 1100 series, Hewlett packard, U.S.A)로 측정하였다. Column은 CAPCELL PAK C18 UG 120 (5 μ m, 4.6 × 250 mm, Shiseido, Tokyo, Japan), methanol: water: formic acid = 19.5: 82.5: 0.3 (v/v/v)을 이동상으로 하여 40°C에서 유속 1 mL/min으로 280 nm에서 검출하였다. 이때 (-)-epigallocatechin (EGC), (+)-catechin (C), epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin gallate(EGCG), epicatechin gallate (ECG)와 caffeine을 표준물질(Sigma Chemical Co., USA)로 사용하였다.

다. 진공포장에 따른 녹차분말의 저장특성 변화

(1) 총 가용성 고형분 함량

Aluminum weighing dish에 침출액 30ml를 취해 105°C에서 상압 가열법에 의해 항량에 이를 때까지 건조한 후 건조전과 건조후의 중량차이를 이용해 총 가용성 고형분 함량을 구하였다.

(2) 색도

녹차침출액의 색도측정은 각 침출액을 방냉 시킨 후 여과지

(Whatman No. 2)로 여과시킨 후 색차계 (Minolta, Chromameter CR-310)를 사용하여 L(lightness), a(redness), b(yellowness)값을 측정하였으며 Hunter 식으로 색차(ΔE)를 계산하였다. 이때 표준 증류수의 값으로 L은 100, a는 -0.01, b는 0.03이었다.

(3) 외관

저장기간에 따른 녹차엽과 분말의 외관의 변화를 사진 촬영하여 관찰하였다.

(4) 항산화 활성 측정

(가) DPPH radical scavenging activity

녹차침출액의 DPPH radical 소거활성은 침출액 0.1 mL에 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 메탄올 용액(4 mg/100 mL) 4 mL씩을 vortex로 균일하게 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 UV/Vis-spectrophotometer(Shimadzu Co., Japan)로 측정하였다. 각 시료를 3회 반복실험을 실시하여 평균하였다.

(나) 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)(ABTS) radical 소거능

ABTS radical 소거능 측정은 Re et al. (1999)의 방법을 이용하였다. 7 mM ABTS에 2.45 mM potassium persulfate를 첨가하여 암소에서 실온으로 12-16시간 방치한 후 414 nm에서 흡광도가 1.4-1.5가 되도록 증류수로 희석시켰다. 알코올과 물로 각각 추출한 시료 12.5 μ L에 희석된 ABTS radical 용액 250 μ L을 넣어 90분간 반응시키고 414 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{*Radical scavenging activity (\%)} = (1 - A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}) \times 100$$

(다) Reducing power

시료 2.5 mL에 sodium phosphate buffer(2.5 mL, 200 mM, pH 6.6)와 1% potassium ferricyanide(2.5 mL)를 혼합시킨 후 혼합물을 50°C에서 20분 동안 incubation 시킨 다음 trichloroacetic acid(2.5 mL, 10%, w/v)를 첨가하여 650 \times g에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 한 상정액(5 mL)에 탈이온수(5 mL)와 1% ferric chloride 1 mL를 첨가시킨 후 UV-spectrophotometer를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(5) 녹차분말의 물리적 특성

(가) Caking behavior

먼저 분말을 250 μ m sieve를 통해 통과시킨 후 20 $^{\circ}$ C의 온도에서 수분 활성도가 0~0.93로 일정하게 유지된 데시케이터에 1.5g씩 넣고 4주동안 저장하는 동안 각각의 샘플을 250 μ m sieve를 통해 통과한 분말의 중량 (g)을 상대습도 20%에서 측정하였다.

$$C = \frac{M_T - M_F}{M_T} \times 100$$

C: caking index(%)

M_T: the total mass of sample(g)

M_F: the mass of fines that passed through the sieve(g)

(나) Tapping test에 따른 분말의 부피감소를 측정

20 $^{\circ}$ C의 온도에서 수분활성도가 0~0.81로 일정하게 유지된 각각의 분말샘플을 50 mL graduated cylinder에 넣고 120 mm의 높이에서 부피 변화가 없을 때까지 자유낙하(tapping)시키는 횟수마다 부피를 측정하여 그 변화량을 계산하였다.

라. 녹차 분말음료의 제조공정 확립 및 저장 안정성 분석

(1) 제조공정

녹차 분말음료를 제조하기 위한 공정을 확립하기 위해 분쇄, 재료 혼합 비율 등을 선정하였다.

(2) 외관

녹차 분말음료의 저장전과 후의 외관을 비교하기 위해 사진촬영하여 나타내었다.

(3) 색도

녹차침출액의 색도측정은 각 침출액을 방냉 시킨 후 여과지 (Whatman No. 2)로 여과시킨 후 색차계 (Minolta, Chromameter CR-310)를 사용하여 L(lightness), a(redness), b(yellowness)값을 측정하였으며 Hunter 식으로 색차(ΔE)를 계산하였다. 이때 표준 증류수의 값으로 L은 100, a는 -0.01, b는 0.03이었다.

(4) 항산화 활성 측정

(가) DPPH radical scavenging activity

녹차침출액의 DPPH radical 소거활성은 침출액 0.1 mL에 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 메탄올 용액(4 mg/100 mL) 4 mL씩을 vortex로 균일하게 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 UV/Vis-spectrophotometer(Shimadzu Co., Japan)로 측정하였다. 각 시료를 3회 반복실험을 실시하여 평균하였다.

(나) 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)(ABTS) radical 소거능

ABTS radical 소거능 측정은 Re et al.(1999)의 방법을 이용하였다. 7 mM ABTS에 2.45 mM potassium persulfate을 첨가하여 암소에서 실온으로 12-16시간 방치한 후 414 nm에서 흡광도가 1.4-1.5가 되도록 증류수로 희석시켰다. 알코올과 물로 각각 추출한 시료 12.5 µL에 희석된 ABTS radical 용액 250 µL을 넣어 90분간 반응시키고 414 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{*Radical scavenging activity (\%)} = (1 - A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}) \times 100$$

(다) Reducing power

시료 2.5 mL에 sodium phosphate buffer(2.5 mL, 200 mM, pH 6.6)와 1% potassium ferricyanide(2.5 mL)를 혼합시킨 후 혼합물을 50°C에서 20분 동안 incubation 시킨 다음 trichloroacetic acid(2.5 mL, 10%, w/v)를 첨가하여 650 × g에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 한 상정액(5 mL)에 탈이온수(5 mL)와 1% ferric chloride 1 mL를 첨가시킨 후 UV-spectrophotometer를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

마. 감마선 및 원적외선 처리에 따른 녹차 침출액의 저장 안정성 분석

(1) 총 가용성 고형분 함량

Aluminum weighing dish에 침출액 30ml를 취해 105°C에서 상압 가열법에 의해 항량에 이를 때까지 건조한 후 건조전과 건조후의 중량차이를 이용해 총 가용성 고형분 함량을 구하였다.

(2) 항산화 활성 측정

(가) DPPH radical scavenging activity

녹차침출액의 DPPH radical 소거활성은 침출액 0.1 mL에 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 메탄올 용액(4 mg/100 mL) 4 mL씩을 vortex로 균일하게 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 UV/Vis-spectrophotometer(Shimadzu Co., Japan)로 측정하였다. 각 시

료를 3회 반복실험을 실시하여 평균하였다.

(나) 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)(ABTS) radical 소거능

ABTS radical 소거능 측정은 Re et al. (1999)의 방법을 이용하였다. 7 mM ABTS에 2.45 mM potassium persulfate을 첨가하여 암소에서 실온으로 12-16시간 방치한 후 414 nm에서 흡광도가 1.4-1.5가 되도록 증류수로 희석시켰다. 알코올과 물로 각각 추출한 시료 12.5 μ L에 희석된 ABTS radical 용액 250 μ L을 넣어 90분간 반응시키고 414 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{*Radical scavenging activity (\%)} = (1 - A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}) \times 100$$

(다) Reducing power

시료 2.5 mL에 sodium phosphate buffer(2.5 mL, 200 mM, pH 6.6)와 1% potassium ferricyanide(2.5 mL)를 혼합시킨 후 혼합물을 50°C에서 20분 동안 incubation 시킨 다음 trichloroacetic acid(2.5 mL, 10%, w/v)를 첨가하여 650 \times g에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 한 상정액 (5 mL)에 탈이온수(5 mL)와 1% ferric chloride 1 mL를 첨가시킨 후 UV-spectrophotometer를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

바. 초음파 추출법을 통한 녹차 유용성분의 추출효율 개선

(1) 총 가용성 고형분 함량

Aluminum weighing dish에 침출액 30ml를 취해 105°C에서 상압 가열법에 의해 항량에 이를 때까지 건조한 후 건조전과 건조후의 중량차이를 이용해 총 가용성 고형분 함량을 구하였다.

(2) Catechin류 및 caffeine 함량 측정

Catechin류와 caffeine의 함량은 Bae et al., 2001의 방법을 이용해 HPLC (Agilent 1100 series, Hewlett packard, U.S.A)로 측정하였다. Column은 CAPCELL PAK C18 UG 120 (5 μ m, 4.6 \times 250 mm, Shiseido, Tokyo, Japan), methanol: water: formic acid = 19.5: 82.5: 0.3 (v/v/v)을 이동상으로 하여 40°C에서 유속 1 mL/min으로 280 nm에서 검출하였다. 이때 (-)-epigallocatechin (EGC), (+)-catechin (C), epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin gallate(EGCG), epicatechin gallate (ECG)와 caffeine을 표준물질(Sigma Chemical Co., USA)로 사용하였다.

(3) 총 phenol성 화합물

녹차의 총 phenol성 화합물은 Graham et al., 1992의 방법을 이용해 분석하였다. 시료를 50% Methyl alcohol로 추출한 후 추출액 0.1 mL에 증류수 3 mL, 0.016 M 포타슘 페리시아나이드($K_3Fe(CN)_6$) 1mL, 0.01 M 삼염화철($FeCl_3/0.1N HCl$)용액 1 mL를 넣고 혼합한 후 15분간 방치하고, 안정제($H_2O : 1\% \text{ gum arabic} : 85\% \text{ phosphoric acid} = 3 : 1 : 1, v/v/v$) 5 mL 첨가한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 몰식자산(gallic acid)으로 작성한 검량곡선으로 함량을 환산하였다.

(4) Flavonol류

녹차에 함유되어 있는 flavonol류의 함량은 Kim et al., 2002의 방법을 이용해 분석하였다. 침출액 16 mL에 99.99% ethanol 24 mL과 6 M-HCl 5 mL를 첨가한 후 95°C 수욕상에서 2시간 동안 환류냉각 시킨다. 이 추출물을 50 mL volumetric flask를 이용하여 60% ethanol로 volume을 50 mL가 되게 정용한 다음 0.45 μm filter로 여과하여 HPLC(Hewlett packard 1100 series, U.S.A)로 분석하였다.

Table HPLC conditions for analysis of flavonols

Items	Conditions
Instrument	Hewlett packard 1100 series
Column	HP hypersil ODS(200×4.6 mm, 40°C)
Solvent	30% acetonitrile in 0.025 M KH_2PO_4
Flow rate	1.0 mL/min.
Detector	UV detector(370 nm)
Injection volume	20 μL

(5) 유리아미노산

유리아미노산 분석은 Oh et al., 2002의 방법을 변형하여 침출액을 일정량 취하여 rotary vacuum evaporator를 이용하여 수분을 완전 제거하고 Lithium citrate buffer (pH 2.2) 를 10 mL로 용해한 후 sulfosalicylic acid 0.5 g을 첨가하여 상온에서 2시간 동안 방치한 후 0.22 μm membrane filter로 여과한 여액을 아미노산 자동분석기(Biochrom 30, Biochrom Ltd, Cambrige, UK)를 이용하여 분석하였다.

Table The operating condition for amino acids autoanalyzer

Items	Conditions
Instrument	Biochrom 30, Biochrom Ltd, Cambrige, UK
Column	High resolution sodium column
Flow rate	Buffer 25 mL/hr, ninhydrin 20 mL/hr
Column temp.	48°C
Injection volume	40 μ L

사. 고기호성 녹차 음료 제조를 위한 최적 추출조건 확립

(1) 총 가용성 고형분 함량

Aluminum weighing dish에 침출액 30ml를 취해 105°C에서 상압 가열법에 의해 항량에 이를 때까지 건조한 후 건조전과 건조후의 중량차이를 이용해 총 가용성 고형분 함량을 구하였다.

(2) 총 질소 화합물 함량 및 총 탄닌 함량

총 질소화합물 함량은 Auto-Kjeldahl법에 의해 측정하였고, 총 탄닌 함량은 Folin-Denis법에 의해 녹차침출액 100 μ l에 Folin-Denis용액과 Na₂CO₃용액으로 발색시켜 분광광도계로 760 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 최적 추출조건 확립

반응표면분석(response surface methodology, RSM)을 위하여 SAS (statistical analysis system) program을 이용하여 침출조건에 따른 녹차 침출액의 최적화를 실시하였고, Sigma plot software를 이용해 counter mapping하였다. 즉 녹차침출 시 침출온도(extraction temperature; X₁)와 침출시간(extraction time; X₂)을 독립변수(X_n)로 하고 Table 1과 같이 -2, -1, 0, +1, +2의 다섯단계로 부호화하여 녹차침출액의 품질특성에 관련된 총 질소화합물(Y₁), 총 탄닌함량(Y₂), N/T값(Y₃)을 종속변수(Y_n)로 하였다.

Table 1. Levels of independent variables in experimental design

X _i	Independent variables	Level				
		-2	-1	0	1	2
X ₁	Extraction temperature (°C)	40	40(Ultra)	60	80	90
X ₂	Extraction time (min)	3	5	10	15	60

2. 연구개발 수행 결과

가. 저장환경에 따른 녹차엽과 분말의 저장 안정성

(1) 총 가용성 고형분 함량

녹차분말의 저장시 수분활성도 조건에 따른 총 가용성 고형분의 함량을 Fig. 1-1에 나타내었다. 수분활성도가 높을수록 총 가용성 고형분 함량이 낮게 나타났다. 저장기간 2주까지는 차이가 거의 없었으나 3주째부터 수분활성도에 따른 차이가 나타났으며 모든 시료에서 저장기간에 따라 감소하는 경향을 보였다. 수분활성도 0.69와 0.81에서는 4주차에 각각 13, 17%의 고형분 함량 감소를 보였다. 이는 저장 환경에 따라 녹차 분말에 함유된 성분이 저장 안정성이 낮아 저장기간이 길어질수록, 습도가 높을수록 녹차의 성분이 소실될 가능성이 높기 때문인 것으로 사료된다. 결과적으로 상대습도가 69% 이상인 환경조건은 분말의 저장에 부적합한 것으로 사료된다.

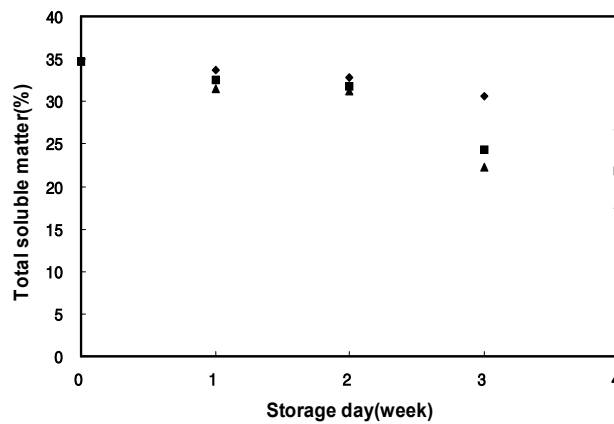


Fig. 1-1. Total soluble matter contents of green tea powder infusion at different water activity under storage days. ◆ : Aw=0.23, ■ : Aw=0.69, ▲ : Aw=0.81

녹차엽의 저장시 수분활성도 조건에 따른 총 가용성 고형분의 함량을 Fig.1-2에 나타내었다. 수분활성도가 높을수록 총 가용성 고형분 함량이 낮게 나타났지만, 녹차 분말에 비해 시료간의 차이는 적었다. 수분활성도 0.23과 0.69에서는 거의 차이가 없었고, 0.81에서는 약 3% 낮게 나타났다. 저장

기간에 따라서도 1주차부터 약간 감소한 이후 4주차까지는 큰 변화가 없었다.

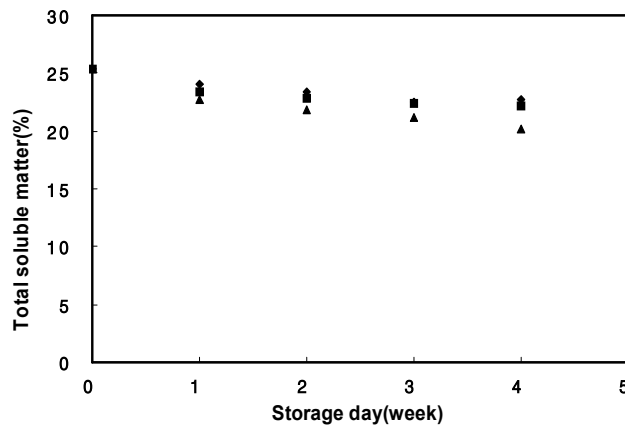


Fig. 1-2. Total soluble matter contents of green tea leaves infusion at different water activity under storage days. ◆ : $A_w=0.23$, ■ : $A_w=0.69$, ▲ : $A_w=0.81$

(2) 색도

녹차분말의 저장 시 수분활성도 조건에 따른 색도의 변화를 Table 1-1에 나타내었다. L-value는 저장기간이 길어지고, 수분활성도가 높을수록 낮아지는 경향을 보였고, a-value는 저장기간에 따라 약 -10에서 0에 가까워지는 경향을 보였으며, 수분활성도가 높을수록 더욱 높은 값을 보였다. 그리고 b-value는 저장기간과 수분활성도의 변화에 따른 차이가 거의 나타나지 않았다.

Table 1-1. The color of green tea powder determined by L, a, b values at different water activity under storage days

Period (week)	Water activity								
	0.23	0.69	0.81	0.23	0.69	0.81	0.23	0.69	0.81
	L-value			a-value			b-value		
0	61.55	61.55	61.55	-10.23	-10.23	-10.23	21.24	21.24	21.24
1	59.74	58.55	57.22	-6.48	-6.29	-5.97	19.73	21.43	21.51
2	59.07	56.70	54.40	-6.28	-5.67	-5.00	19.95	20.76	20.40
3	58.31	57.38	53.37	-6.12	-5.55	-4.58	19.81	20.89	20.96
4	58.73	56.01	54.11	-6.09	-5.22	-4.40	19.75	20.64	21.48

차엽의 경우 Table 1-2와 같이 L-value는 1주차는 변화가 없었으며 2주차부터 4주차까지 저장기간이 길어질수록 높아지고, 수분활성도가 높을수록 높은 경향을 보였다. a-value는 1주차에 약간 높아졌고, 이후에는 거의 변화가 없었고, 수분활성도에 따라서도 차이가 거의 없었다. b-value의 경우 L-value와 같이 1주차는 변화가 없었으며, 2주차부터 4주차까지 저장기간이 길어질수록 높아지고, 수분활성도가 높을수록 높은 경향을 보였다.

Table 1-2. The color of green tea leaves determined by L, a, b values at different water activity under storage days

Period (week)	Water activity								
	0.23	0.69	0.81	0.23	0.69	0.81	0.23	0.69	0.81
	L-value			a-value			b-value		
0	45.04	45.04	45.04	-5.89	-5.89	-5.89	9.68	9.68	9.68
1	45.33	45.24	45.84	-3.21	-3.21	-3.17	8.89	9.60	9.33
2	42.93	48.48	50.63	-2.77	-3.32	-3.38	7.99	9.74	11.31
3	46.87	50.18	51.46	-3.72	-3.72	-3.55	10.83	12.12	12.91
4	47.11	47.29	52.10	-3.45	-3.03	-3.46	10.51	10.28	12.80

녹차분말 침출액의 저장시 수분활성도 조건에 따른 색도의 변화를 Table 1-3에 나타내었다. L-value의 경우 저장기간이 길어질수록 증가하는 경향을 보였으며, 2주차까지는 수분활성도에 따른 차이가 거의 없었으며, 3주차 부터는 변화가 없었으며, 0.23에서만 0.69와 0.81에 비해 약간 낮은 값을 보였다. 또 a-value는 저장기간이 길어질수록 높아졌으며, 2주차까지는 수분활성도에 따른 차이를 보이지 않았으며, 3주차부터는 높은 수분활성도일수록 0에 가까워지는 값을 보였다. b-value의 경우 저장기간이 길어질수록 낮아졌으며, 3주차부터 수분활성도가 높을수록 낮아지는 경향을 보였다.

Table 1-3. The color of green tea powder infusion determined by L, a, b values at different water activity under storage days

Period (week)	Water activity								
	0.23	0.69	0.81	0.23	0.69	0.81	0.23	0.69	0.81
	L-value			a-value			b-value		
0	87.16	87.16	87.16	-7.69	-7.69	-7.69	33.32	33.32	33.32
1	90.03	90.42	90.80	-6.39	-5.86	-5.89	28.32	26.83	26.20
2	88.75	88.90	88.27	-6.50	-6.40	-6.70	29.26	29.82	32.07
3	91.26	93.09	93.97	-5.50	-4.68	-4.07	23.27	19.76	17.18
4	91.60	93.66	93.18	-6.01	-4.51	-4.78	24.64	19.10	20.15

녹차엽 침출액의 경우 Table 4와 같이 저장기간과 수분활성도의 변화에 따른 차이가 거의 나타나지 않았다. 이로써 녹차엽 침출액의 저장기간 및 수분활성도에 대한 색도에 있어서의 stability가 타 조건에 비해 가장 높은 것을 알 수 있었다.

Table 1-4. The color of green tea infusion determined by L, a, b values at different water activity under storage days

Period (week)	Water activity								
	0.23	0.69	0.81	0.23	0.69	0.81	0.23	0.69	0.81
	L-value			a-value			b-value		
0	98.62	98.62	98.62	-1.26	-1.26	-1.26	5.49	5.49	5.49
1	98.40	98.51	98.58	-1.14	-1.21	-1.12	5.44	5.78	5.51
2	98.66	98.39	98.37	-1.19	-1.13	-0.98	5.64	5.83	5.78
3	98.61	98.40	98.58	-1.14	-0.87	-0.89	5.56	5.60	5.38
4	98.60	98.46	98.59	-1.23	-1.03	-1.10	5.71	5.86	5.97

(3) 외관

녹차 분말의 저장 시 수분활성도에 따른 외관의 변화를 관찰하여 Fig. 1-3에 나타내었다. 수분활성도 0.23에서는 4주차까지만 변화가 나타나지 않았으나, 0.69와 0.81에서는 1주차부터 caking 현상이 일어나기 시작해 4주차에는 몇 개의 덩어리로 뭉쳐진 형태를 보였다. 따라서 녹차분말을 저장하는데 가장 적합한 습도가 수분활성도 0.23인 것으로 사료된다.

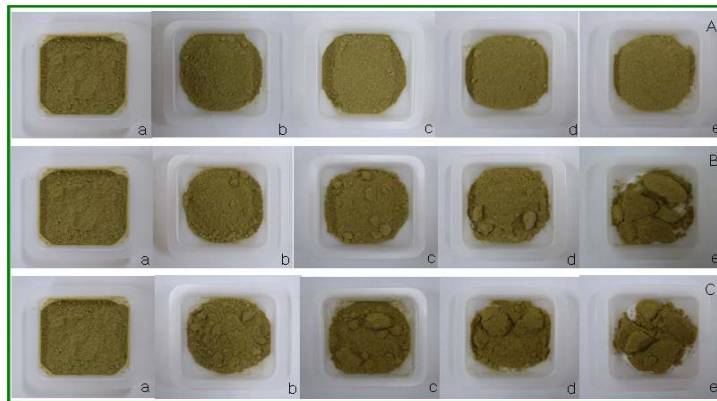


Fig. 1-3. Photograph of green tea powder under storage conditions.

A) : $A_w=0.23$, B) : $A_w=0.69$, C) : $A_w=0.81$

a : 0 week, b : 1 week, c : 2 week, d : 3 week, e : 4 week.

녹차엽의 저장시 수분활성도에 따른 외관의 변화를 관찰하여 Fig. 1-4에 나타내었다. 수분활성도 0.23에서는 4주차까지만 변화가 나타나지 않았으나, 0.69에서는 2주차부터 갈변이 미세하게 일어나기 시작했으나, 4주차까지 갈변이 더욱 진행되지는 않았다. 하지만 0.81에서는 1주차부터 갈변이 일어나기 시작했으며, 2, 3, 4주차로 저장기간이 길어짐에 따라 갈변이 크게 일어났다.

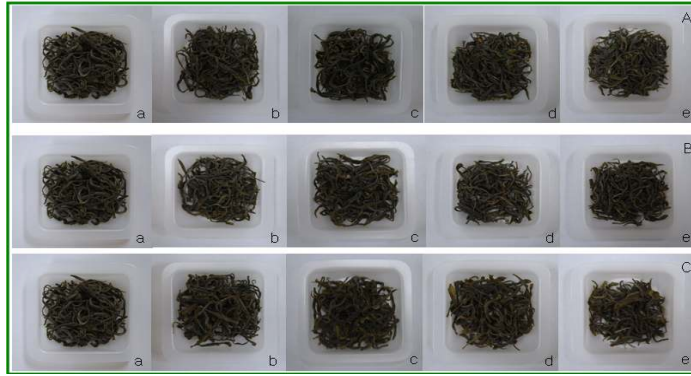


Fig. 1-4. Photograph of green tea under storage conditions.

A) : $A_w=0.23$, B) : $A_w=0.69$, C) : $A_w=0.81$

a : 0 week, b : 1 week, c : 2 week,

d : 3 week, e : 4 week.

녹차엽 및 분말의 침출액 저장 시 수분활성도에 따른 외관의 변화를 관찰하여 Fig. 1-5 및 Fig.1-6에 나타내었다. 저장기간과 수분활성도에 따른 차이가 거의 나타나지 않았다.

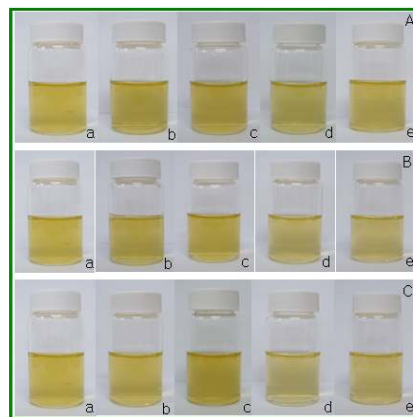


Fig. 1-5. Photograph of green tea powder infusion under storage conditions.

A) : $A_w=0.23$, B) : $A_w=0.69$, C) : $A_w=0.81$

a : 0 week, b : 1 week, c : 2 week, d : 3 week, e : 4 week.

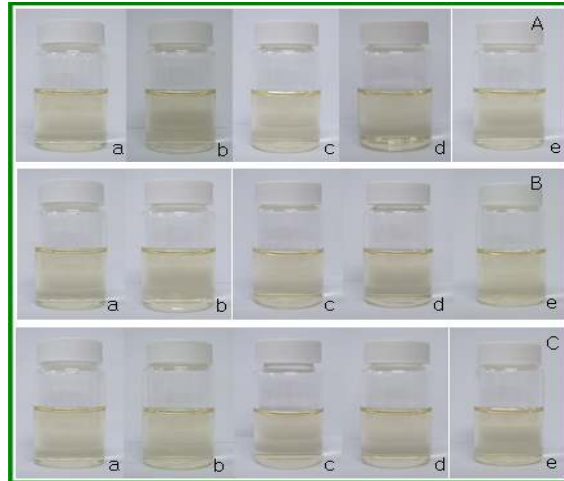


Fig. 1-6. Photograph of green tea leaf infusion under storage conditions.

A) : $A_w=0.23$, B) : $A_w=0.69$, C) : $A_w=0.81$

a : 0 week, b : 1 week, c : 2 week, d : 3 week, e : 4 week.

(4) 항산화 활성

(가) DPPH radical scavenging activity

녹차분말과 녹차엽의 저장시 저장기간과 수분활성도에 따른 DPPH radical의 소거 활성을 Fig. 1-7과 Fig. 1-8에 나타내었다. 저장기간과 수분활성도에 따른 차이가 거의 나타나지 않았다

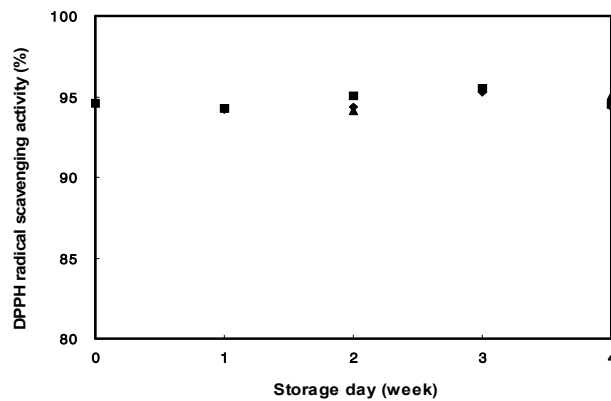


Fig. 1-7. DPPH radical scavenging activity of green tea powder infusion determined at different water activity under storage days. ◆ : $A_w=0.23$, ■ : $A_w=0.69$, ▲ : $A_w=0.81$

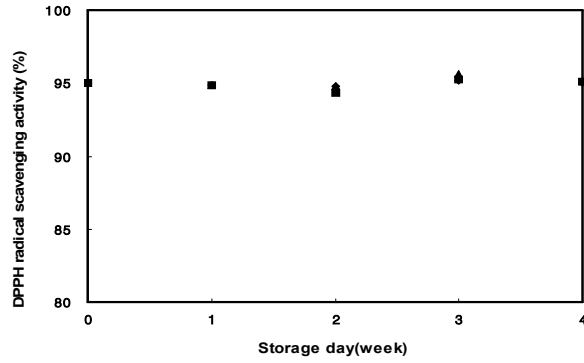


Fig. 1-8. DPPH radical scavenging activity of green tea infusion determined at different water activity under storage days. ◆ : $A_w=0.23$, ■ : $A_w=0.69$, ▲ : $A_w=0.81$

(나) Reducing powder

녹차분말과 녹차엽의 저장시 저장기간과 수분활성도에 따른 환원력을 Fig. 1-9와 Fig. 1-10에 나타내었다. 분말의 경우는 2주차까지는 변화가 없었고, 3주차부터 4주차까지 0.23에서는 변화가 없었으며, 수분활성도가 높을수록 낮게 나타났다. 하지만 녹차엽의 경우는 저장기간에 따른 차이를 보이지 않았으며, 0.23에서 0.69와 0.81에 비해 약간 높게 나타났다.

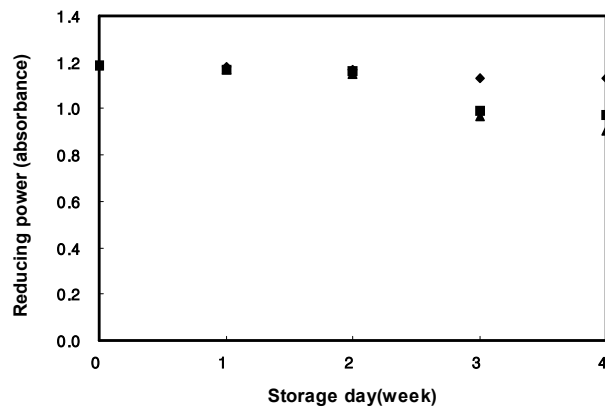


Fig. 1-9. Reducing power of green tea powder infusion at different water activity under storage days. ◆ : $A_w=0.23$, ■ : $A_w=0.69$, ▲ : $A_w=0.81$

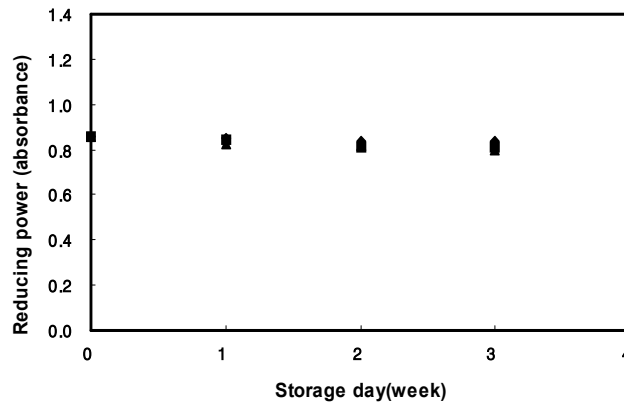


Fig. 1-10. Reducing power of green tea infusion at different water activity under storage days. ◆ : $A_w=0.23$, ■ : $A_w=0.69$, ▲ : $A_w=0.81$

(5) 녹차 분말의 물리적 특성

(가) Caking 특성

녹차분말의 물리적 특성 중 수분활성도별 저장기간에 따른 caking률을 Fig. 1-11에 나타내었다. 저장기간이 길어질수록 대체적으로 caking률이 증가했다. 4주차에 수분활성도 0.23에서 caking률이 약 18%로 가장 낮게 나타났으며, 0.69에서는 약 36%, 0.81에서는 84%로 매우 높게 나타났다. 이는 수분활성도가 높은 환경, 즉 습도가 높을수록 분말이 공기 중의 수분과 접촉이 많아져 덩어리가 생기게 되기 때문인 것으로 사료된다.

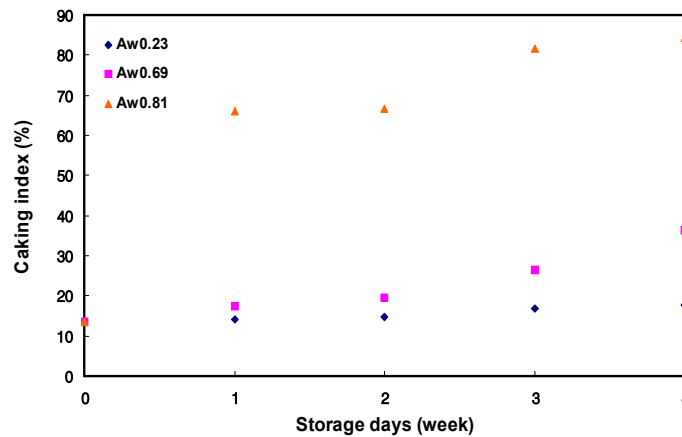


Fig. 1-11. Caking index of green tea powder at different water activity under storage days.

(나) Tapping test에 의한 부피 감소율

녹차분말의 물리적 특성 중 tapping test에 의한 부피 감소율을 Fig. 1-12와 Table 1-5에 나타내었다. 저장기간에 관계없이 수분활성도가 높을수록 부피 감소율이 증가했다. 이는 앞의 caking 특성에서 본 결과와 같이 저장환경에 따라 습도가 높을수록 덩어리가 많아지고, 이에 따라 분말 중의 덩어리간 공극의 증가하기 때문으로 사료된다.

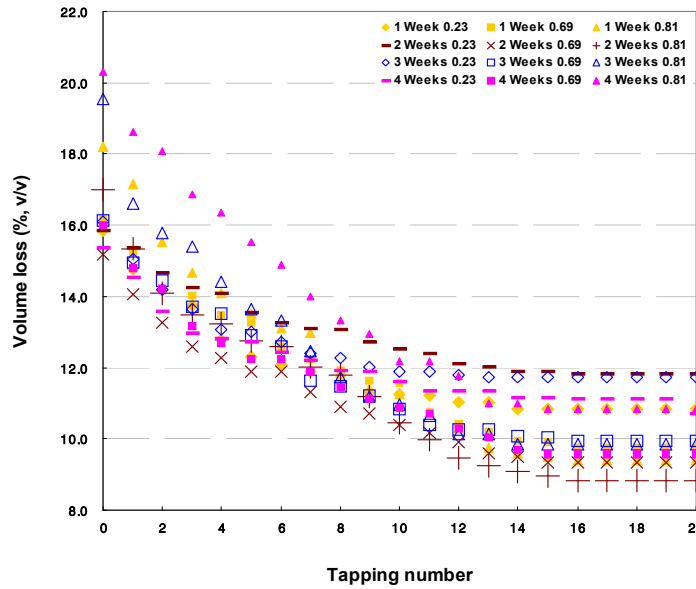


Fig. 1-12. Volume index of green tea powder at different water activity under storage days

Table 1-5. Volume loss index of green tea powder at different water activity under storage days

(unit: %)

Tapping NO	control	1 Week			2 Weeks			3 Weeks			4 Weeks		
		water activity											
		0.23	0.69	0.81	0.23	0.69	0.81	0.23	0.69	0.81	0.23	0.69	0.81
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	7	7	6	6	3	8	11	7	8	18	0.06	0.08	0.09
2	15	12	14	17	8	14	20	13	12	24	0.13	0.12	0.12
3	20	16	15	24	11	0	26	18	18	27	0.19	0.21	0.20
4	25	24	20	29	12	23	28	23	19	36	0.20	0.26	0.24
5	25	29	22	35	17	28	33	24	25	43	0.21	0.31	0.31
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	38	46	66	93	34	63	92	37	62	99	0.38	0.68	0.87
17	38	46	66	93	34	63	92	37	62	99	0.38	0.68	0.87
18	38	46	66	93	34	63	92	37	62	99	0.38	0.68	0.87
19	38	46	66	93	34	63	92	37	62	0.99	0.38	0.68	0.87
20	38	46	66	93	34	63	92	37	62	0.99	0.44	0.68	0.87

나. 녹차침출액(음료)의 저장안정성

(1) 항산화 활성

(가) DPPH radical scavenging activity

녹차침출액의 저장온도, 공기 및 광선유무, 산화방지제등 저장조건에 따른 DPPH radical 소거 활성을 살펴보면 Fig. 1-13과 같다. 초기상태의 녹차침출액 DPPH radical 소거 활성은 96.02%로 나타났다. 냉장저장 시 2와 4주에서 94.79, 93.35%로 약 3%정도 저하되었고, 상온저장 시 82.02, 80.43%, 상온에서 공기출입 했을 경우 87.24, 69.06%, 광선차단은 91.67, 90.90%, 산화방지제(ascorbic acid) 첨가 시 89.62, 90.50%로 각각 나타났으며, 상온에서 공기출입 한 조건에서 DPPH radical 소거 활성이 약27%정도로 가장 많이 저하됨을 확인하였다. 이 결과 녹차침출액의 DPPH radical 소거 활성은 저장온도에 영향을 가장 많이 받는 것을 확인하였다.

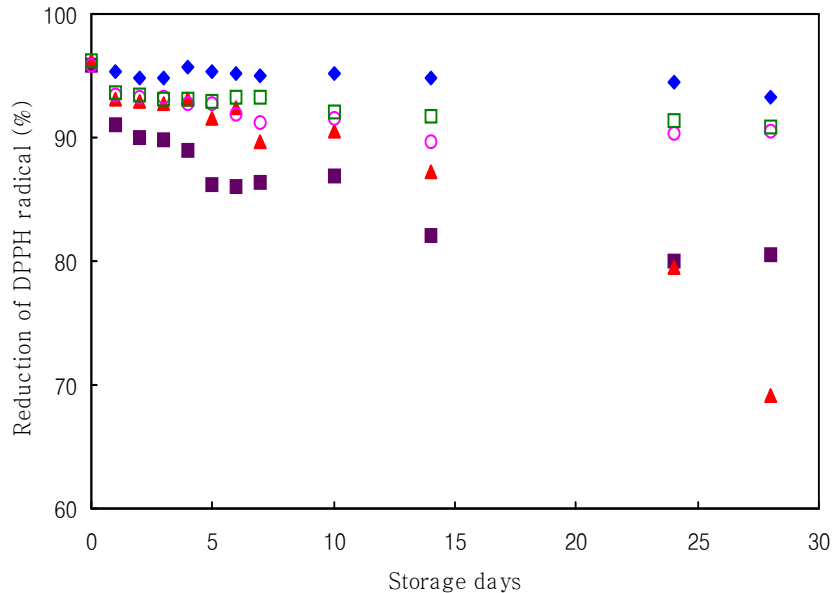


Fig. 1-13. DPPH radical scavenging activity of green tea infusion under storage conditions.

◆ : Cold storage (4°C), ■ : Ambient temperature, ▲ : The presence air
 ○ : Add ascorbic acid, □ : Blocked light

(나) Reducing powder

저장조건에 따른 녹차침출액의 환원력을 측정 한 결과 Fig. 1-14와 같다. 환원력에서의 흡광도 수치는 그 자체가 시료의 환원력을 나타내며, 높은 환원력을 가지는 물질은 흡광도의 수치가 높게 나타난다. 냉장저장 시 4주 동안 환원력을 측정 해 본 결과 1.549에서 1.405로 가장 변화가 적었고, 상온에서 공기출입 했을 경우 1.549에서 0.565로 가장 큰 변화를 나타내었다. 그리고 상온저장 시 산화방지제를 첨가했을 경우 상온저장에 비해 0.639에서 1.078로 다소 높은 환원력을 나타내었다. 따라서 저장조건에 따른 녹차침출액의 환원력은 저장온도가 가장 큰 요인인 것을 확인하였다.

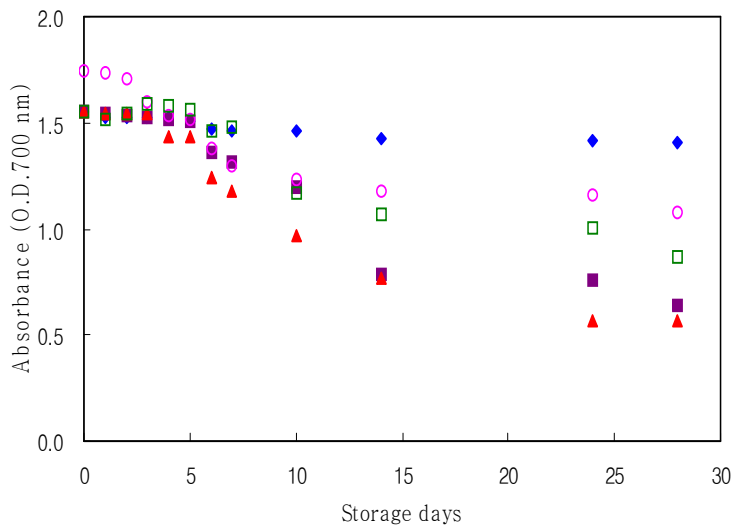


Fig. 1-14. Reducing power of green tea infusion under storage conditions.

◆ : Cold storage (4°C), ■ : Ambient temperature, ▲ : The presence air
○ : Add ascorbic acid, □ : Blocked light

(2) 저장기간별 색도

녹차의 수색은 음용 이전에 사람의 시각에 호소하여 차로서 입맛을 돋우는 역할을 하므로 차의 품질 평가 시 매우 중요한 요소이다. 이러한 식품의 색을 측정하는 방법에는 색의 감지기능을 광학적으로 모방한 색차계를 사용하는 방법과 분광학적인 방법으로 흡광도를 측정하여 결정하는 방법이 일반적으로 사용되고 있는데 본 실험에서는 색차계를 이용하여 측정하였다. 색도 변화를 종합적으로 비교해 보면 Table 1-6 ~ 10과 같다. 녹차침출액 원액 상태의 ΔE 값이 97.62에서 냉장저장 시 2, 4주에서 98.60, 95.43, 상온저장은 78.08, 63.09 상온에서 공기출입 했을 경우는 71.49, 48.03, 광선차단은 89.67, 91.08 ascorbic acid 첨가 시 86.5, 90.90로 나타났다. 색변화 역시 상온에서 공기출입 한 조건에서 가장 크게 저하됨을 확인 할 수 있었다.

Table 1-6. The color of green tea infusions determined by L, a, b values as a function of storage at ambient temperature

Day	Color values			ΔE
	L	a	b	
0	96.68	-3.27	13.14	97.62
1	95.96	-2.96	14.15	97.05
2	97.51	-2.05	9.56	97.99
3	95.69	-2.72	12.02	96.48
4	82.76	-1.16	26.20	86.81
5	73.14	2.01	33.96	80.66
6	60.28	9.59	44.97	75.81
7	69.52	4.76	42.77	81.76
10	75.23	7.46	50.99	91.19
14	37.25	30.32	61.57	78.08

Table 1–7. The color of green tea infusions determined by L, a, b values as a function of storage at 4 °C

Day	Color values			ΔE
	L	a	b	
0	96.68	-3.27	13.14	97.62
1	96.74	-3.12	13.05	97.66
2	98.32	-1.97	7.24	98.61
3	99.14	-1.56	7.05	99.40
4	98.47	-1.83	7.30	98.76
5	98.56	-1.94	7.52	98.87
6	98.57	-1.90	7.45	98.86
7	98.25	-1.61	7.51	98.55
10	98.46	-1.89	7.57	98.77
14	98.28	-1.87	7.80	98.60

Table 1–8. The Color of green tea infusions determined by L, a, b values as a function of storage at ambient temperature in the presence air

Day	Color values			ΔE
	L	a	b	
0	96.68	-3.27	13.14	97.62
1	96.62	-3.31	14.93	97.83
2	96.77	-2.48	10.53	97.37
3	92.88	-2.16	12.27	93.71
4	89.56	-2.00	19.08	91.59
5	75.85	3.83	36.15	84.11
6	80.87	3.87	34.84	88.14
7	75.97	6.61	42.40	87.25
10	78.52	4.93	41.57	88.98
14	33.33	30.67	55.31	71.49

Table 1–9. The Color of green tea infusions determined by L, a, b values as a function of storage add ascorbic acid

Day	Color values			ΔE
	L	a	b	
0	97.35	-1.39	7.60	97.65
1	94.77	-0.68	4.85	94.90
2	97.90	-1.04	5.37	98.05
3	96.54	-1.12	6.49	96.77
4	96.00	-1.23	7.10	96.27
5	93.30	-1.23	9.14	93.75
6	92.39	-1.14	9.62	92.90
7	87.99	-1.03	13.16	88.97
10	85.40	-0.84	15.30	86.76
14	84.55	-1.14	18.24	86.50

Table 1–10. The Color of green tea infusions determined by L, a, b values as a function of storage at blocked light

Day	Color values			ΔE
	L	a	b	
0	96.68	-3.27	13.14	97.62
1	96.64	-3.62	15.76	97.99
2	96.97	-2.71	10.59	97.59
3	91.92	-1.48	11.67	92.67
4	94.10	-3.01	13.82	95.16
5	92.99	-3.30	15.41	94.32
6	90.64	-2.47	14.88	91.88
7	85.20	-1.83	16.94	86.89
10	83.03	-1.80	20.49	85.54
14	86.25	-2.03	24.43	89.67

(3) 외관

저장조건에 따른 녹차침출액의 색변화를 사진촬영으로 나타낸 결과 Fig. 1-15와 같다. 냉장저장 시 갈변이 거의 일어나지 않았고, 상온과 상온에서 공기출입 한 두 조건에서 가장 갈변이 많이 진행됨을 확인 할 수 있었다. 그리고 광선을 차단시킨 경우와 산화방지제를 첨가 했을 경우 다소 갈변이 적게 진행되는 것을 확인하였다. 그러므로 녹차침출액의 저장안정성은 저장온도, 공기유무, 광선유무, 산화방지제 첨가 유무에 영향을 받았으며, 이 요소 중 온도에 가장 큰 영향을 받는 것을 확인하였다.

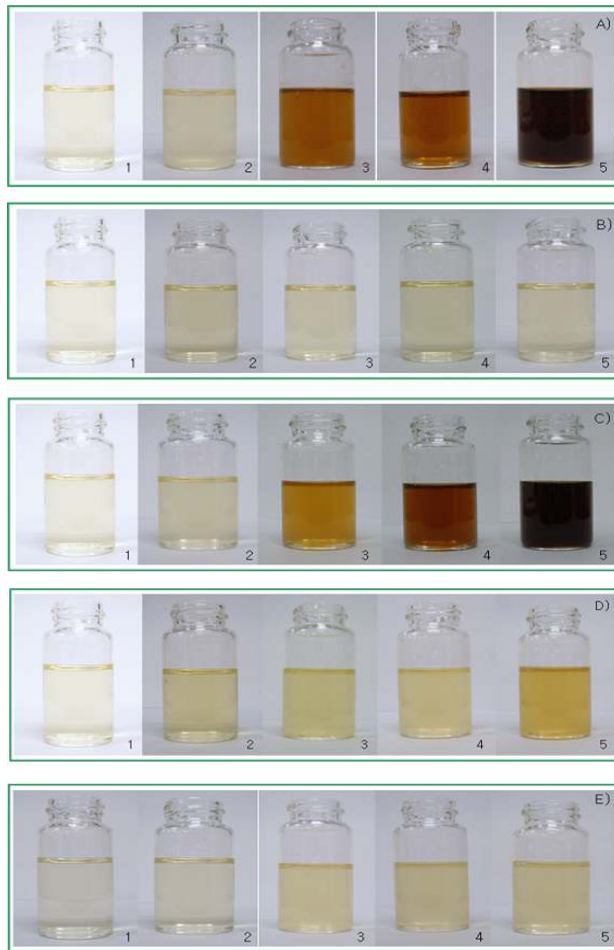


Fig. 1-15. Photograph of green tea infusions under storage conditions.
A) : Ambient temperature, B) : Cold storage(4°C), C) : The presence of air, D) : blocked light, E) : add ascorbic acid,
1 : 0 day, 2 : 3 day, 3 : 7 day, 4 : 10 day, 5 : 14 day

(4) 저장기간별 catechin류 및 caffeine 함량 변화

녹차침출액의 갈변이 가장 많이 진행되는 상온에서 공기출입 한 조건에서 저장기간에 따른 catechin류와 caffeine 함량 변화는 Table 1-11과 같다. 녹차침출액의 catechin류는 EGCg > EGC > ECg > EC > (+)-catechin 순이었으며, EGCg의 함량이 전체의 60.54%로 절반 이상을 차지하였다. 김 등이 녹차침출액의 catechin류 함량이 EGCg > ECg > EC > EGC > (+)-catechin 순으로 많았다고 보고한 것과 다소 다르게 나타났는데, 이는 품종, 수확시기, 침출조건 및 방법의 차이 때문으로 판단된다. 측정된 함량 중 EGC와 EC는 저장기간에 관계없이 거의 변화가 없었지만 catechin류 중 함량이 가장 많은 EGCg는 저장기간 길어짐에 따라 16.28 mg/g에서 0.91 mg/g으로 가장 많이 감소하는 것을 확인하였다. 그리고 총 catechin류는 26.89 mg/g에서 13.99 mg/g으로 약 2배정도 감소하는 경향을 나타내었다.

Caffeine 함량의 경우 저장기간이 길어질수록 1.65 mg/g에서 2.15 mg/g으로 증가하는 경향을 나타내었다. 저장 중 caffeine 함량이 증가하는 이유는 아직까지 구체적으로 밝혀진 바가 없어서, 이에 대한 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

Table 1-11. Changes of catechin and caffeine contents in green tea infusion under storage days

(Unit : mg/g)

Period (day)	Caffeine	EGC	(+) -Catechin	EGCG	EC	ECG	Total catechin
0	1.65±0.02 ^d	5.19±0.18 ^c	0.57±0.03 ^a	16.28±0.57 ^a	1.33±0.04 ^c	3.50±0.10 ^a	26.89
3	1.84±0.02 ^c	4.87±0.16 ^c	0.46±0.01 ^{bc}	12.76±0.51 ^b	1.50±0.06 ^b	2.94±0.12 ^b	22.56
7	1.94±0.008 ^b	10.67±0.17 ^a	0.44±0.01 ^c	0.89±0.02 ^c	2.95±0.08 ^a	0.02±0.009 ^c	14.99
10	2.15±0.01 ^a	9.47±0.17 ^b	0.49±0.03 ^b	0.91±0.04 ^c	3.09±0.09 ^a	0.006±0.003 ^c	13.99

* Results are expressed as means±SD.

** ^{a-d} Means in the same column with different superscripts are significantly different (P<0.05).

다. 진공포장에 따른 녹차분말의 저장 특성 변화

(1) 총 가용성 고형분 함량

녹차분말을 진공포장하였을 때, 1차년도 연구결과에서 나타난 저장성이 가장 낮은 환경인 수분활성도 0.81에서 저장하는 동안에 나타나는 진공포장의 효과를 분석하기 위해 가용성 고형분 함량의 변화를 분석하였다. 녹차분말을 진공포장 한 후 4주 동안 저장하는 동안 가용성 고형분 함량을 측정하여 Fig. 1-16에 나타내었다. 진공포장을 한 경우는 4주 동안 변화가 거의 없었다. 하지만, 포장하지 않은 경우는 저장기간이 길어짐에 따라 감소하였으며, 4주차에는 저장 초기에 비해 약 17%가 감소하였다. 이는 1차년도의 연구결과에서 나타난 바와 같이 상대습도가 높은 저장 환경에 의해 동일한 양의 녹차 분말이 가지는 수분의 양이 증가하여 결과적으로 가용성 고형분의 함량이 감소하였으나, 진공포장을 한 경우는 시료내부의 수분함량의 변화가 없었기 때문에 고형분 함량의 변화가 나타나지 않았다.

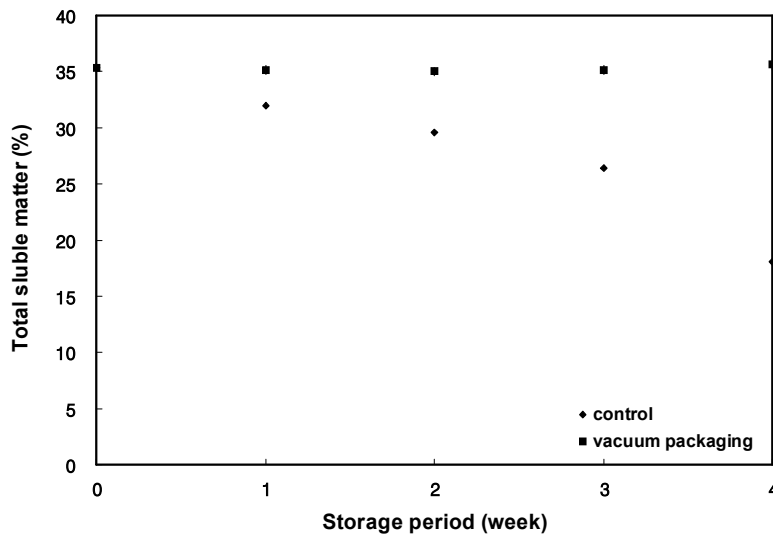


Fig. 1-16. Changes in total soluble matter content of green tea powder infusion treated vacuum packaging. Control: without vacuum packaging.

(2) 색도

녹차분말을 진공포장하였을 때, 1차년도 연구결과에서 나타난 저장성이 가장 낮은 환경인 수분활성도 0.81에서 저장하는 동안에 나타나는 진공포장의 효과를 분석하기 위해 색도의 변화를 Table 1-12과 Fig. 1-17에 나타내었다. 녹차분말을 진공포장 한 후 4주 동안 저장하는 동안 색차계를 이용하여 색도를 측정하여 진공포장을 한 경우는 L, a, b value 모두 4주 동안 변화가 거의 없었다. 하지만, 포장하지 않은 시료에서는 L value는 저장기간이 길어짐에 따라 감소하였고, a-value는 녹색도가 감소하였으며, b-value의 경우는 대조구와 진공포장한 시료 모두 변화가 거의 없었다. 이는 상대습도가 높은 환경에서는 시료의 흡습이 많아져 분말의 색에 변화가 생겨 L-value와 녹색도를 나타낼 수 있는 a-value가 높아진 것으로 생각된다. 결과적으로 볼 때, 진공포장이 녹차분말의 고유의 색을 유지시킬 수 있을 것으로 사료된다.

Table 1-12. Color value of green tea powder treated vacuum packaging.

Period (week)	Water activity					
	control		vacuum packaging		control	
	L-value	a-value	b-value	L-value	a-value	b-value
0	61.55	61.55	-10.23	-10.23	21.24	21.24
1	57.22	61.52	-5.97	-10.78	21.51	20.51
2	54.40	61.73	-5.00	-10.45	20.40	20.13
3	53.37	61.23	-4.58	-10.73	20.96	21.12
4	54.11	60.98	-4.40	-11.01	21.48	20.82

Control: without vacuum packaging.

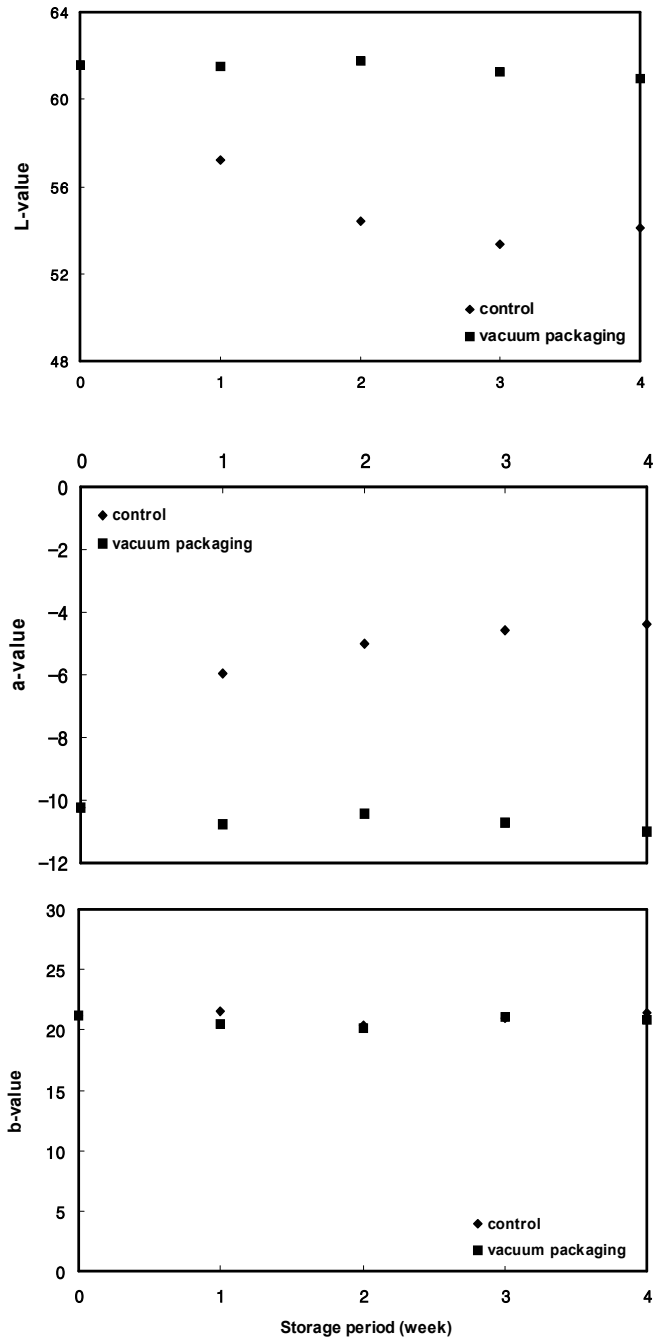


Fig. 1-17 Change in color values of color value of green tea powder treated vacuum packaging. Control: without vacuum packaging.

(3) 외관

녹차분말을 진공포장하였을 때, 1차년도 연구결과에서 나타난 저장성이 가장 낮은 환경인 수분활성도 0.81에서 저장하는 동안에 나타나는 진공포장의 효과를 분석하기 위해 외관의 변화를 관찰하기 위해 녹차분말을 진공포장한 후 4주 동안 저장하는 동안 사진촬영하여 Fig. 1-18에 나타내었다. 가용성 고형분, 색도의 결과와 마찬가지로 진공포장한 경우는 저장하는 동안 외관의 변화가 나타나지 않았다. 역시 진공포장하지 않은 경우는 저장하는 동안 흡습으로 인해 분말이 뭉쳐지는 현상이 일어났으며, 4주차에는 몇 개의 덩어리로 뭉쳐지는 것을 볼 수 있었다.

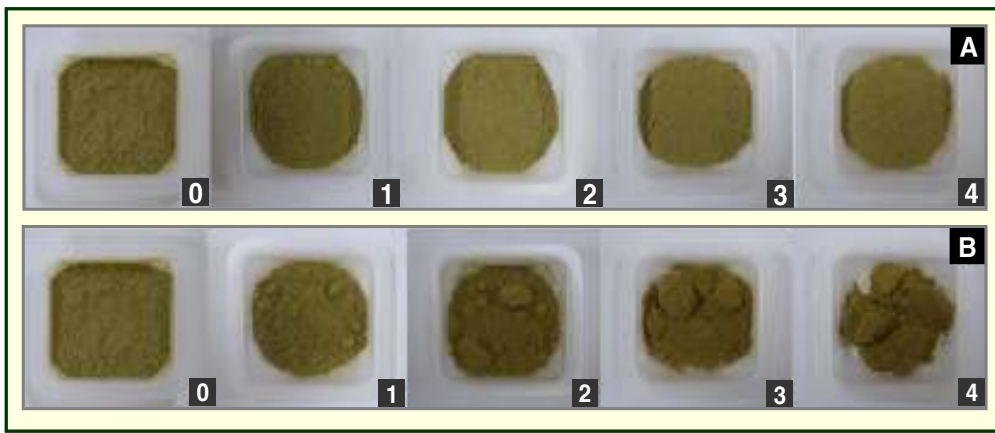


Fig.1-18. Photograph of green tea powder treated vacuum packaging.
A): control(without vacuum packaging), B): vacuum packaging,
Number(0~4): weeks

(4) 항산화 활성

(가) DPPH radical 소거 활성

녹차분말을 진공포장하였을 때, 1차년도 연구결과에서 나타난 저장성이 가장 낮은 환경인 수분활성도 0.81에서 저장하는 동안에 나타나는 시료의 항산화 활성에 대한 진공포장의 효과를 분석하기 위해 DPPH radical 소거 활성능을 측정하여 Fig. 1-19에 나타내었다. 녹차분말을 진공포장 한 후 4주 동안 저장하는 동안 DPPH radical의 소거 활성을 측정한 결과, 진공포장을 하지 않은 대조구 시료와 진공포장 한 시료 모두 DPPH radical 소거 활성이 높게 나타났다. 진공포장에 따른 차이는 크게 나타나지 않았으나, 진공포장한 시료의 활성이 약간 높은 상태로 유지되었다. 이는 녹차분말이 가지는 DPPH radical에 대한 소거 활성능이 상대습도가 높은 조건에서도 영향을 받지 않은 때문으로 사료된다.

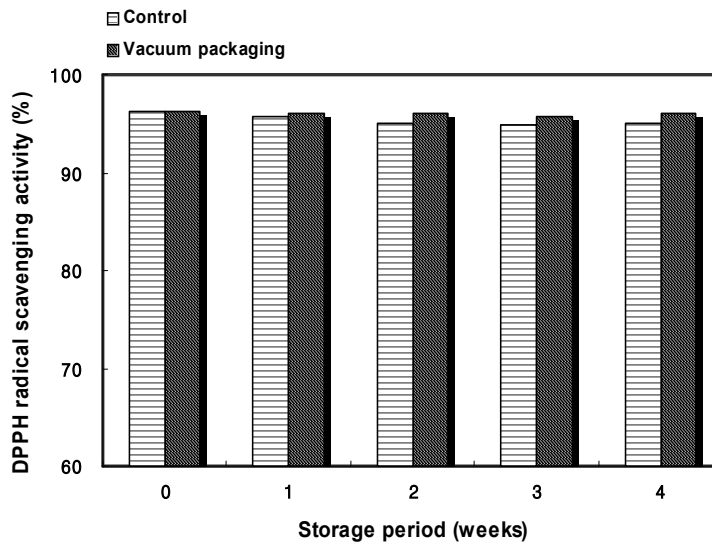


Fig. 1-19. Effect of vacuum packaging on DPPH radical scavenging activity of green tea powder infusion. Control: without vacuum packaging.

(나) ABTS⁺ radical 소거 활성

녹차분말을 진공포장하였을 때, 1차년도 연구결과에서 나타난 저장성이 가장 낮은 환경인 수분활성도 0.81에서 저장하는 동안에 나타나는 시료의 항산화 활성에 대한 진공포장의 효과를 분석하기 위해 ABTS⁺ radical 소거 활성능을 측정하여 Fig. 1-20에 나타내었다. 녹차분말을 진공포장 한 후 4주 동안 저장하는 동안 ABTS⁺ radical의 소거 활성을 측정한 결과, DPPH radical을 이용한 항산화 활성 실험 결과와 마찬가지로 진공포장을 하지 않은 대조구 시료와 진공포장 한 시료 모두 ABTS⁺ radical 소거 활성이 높게 나타났고, 진공포장에 따른 차이는 크게 나타나지 않았으나, 진공포장한 시료의 활성이 약간 높은 상태로 유지되었다.

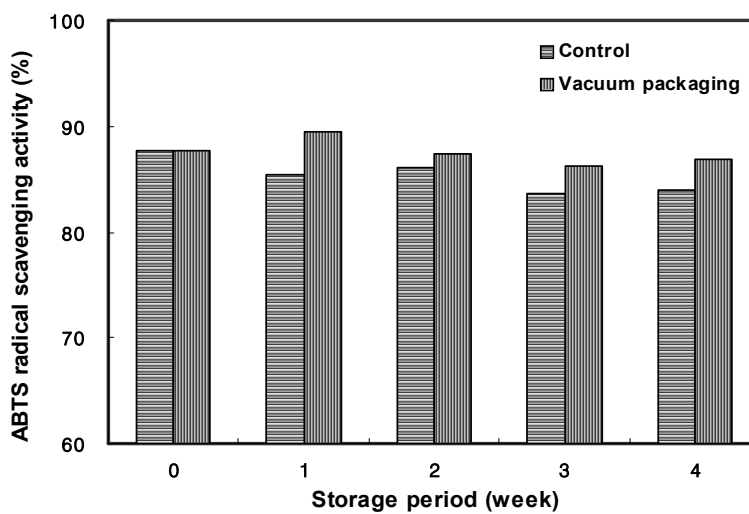


Fig. 1-20. Effect of vacuum packaging on ABTS⁺ radical scavenging activity of green tea powder infusion. Control: without vacuum packaging.

(다) Reducing power

녹차분말을 진공포장하였을 때, 1차년도 연구결과에서 나타난 저장성이 가장 낮은 환경인 수분활성도 0.81에서 저장하는 동안에 나타나는 시료의 항산화 활성에 대한 진공포장의 효과를 분석하기 위해 reducing power을 측정하여 Fig. 1-21에 나타내었다. 녹차분말을 진공포장 한 후 4주 동안 저장하는 동안 reducing power을 측정한 결과, 진공포장을 하지 않은 대조구 시료와 진공포장 한 시료 모두 DPPH radical 소거 활성이 매우 높게 나타났고, 진공포장에 따른 차이는 크게 나타나지 않았으나, 진공포장한 시료의 활성이 약간 높은 상태로 유지되었다. 이는 녹차분말이 가지는 DPPH radical에 대한 소거 활성능이 상대습도가 높은 조건에서도 영향을 받지 않은 때문으로 사료된다.

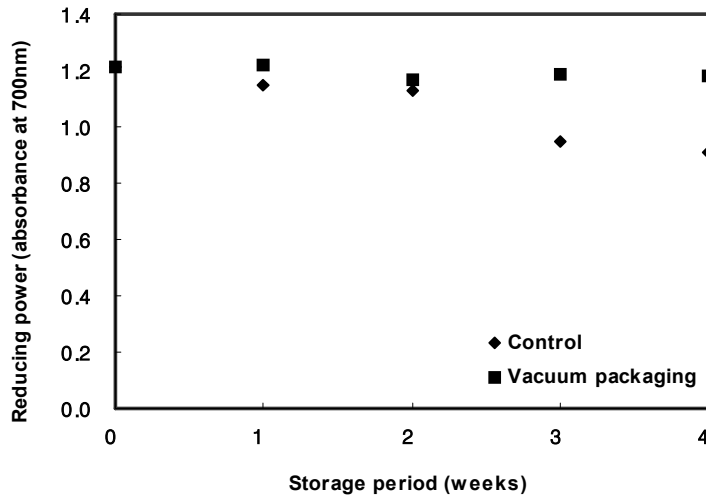


Fig. 1-21. Effect of vacuum packaging on reducing power of green tea powder infusion. Control: without vacuum packaging.

(5) 물리적 특성 변화

(가) Caking behavior (뭉침 현상)

녹차분말을 진공포장하였을 때, 1차년도 연구결과에서 나타난 저장성이 가장 낮은 환경인 수분활성도 0.81에서 저장하는 동안에 나타나는 진공포장의 효과를 분석하기 위해 물리적 특성 중의 하나인 caking behavior을 분석하여 그 결과를 Fig. 1-22에 나타내었다. 녹차분말을 진공포장 한 후 4주 동안 저장하는 동안 caking 율을 측정한 결과, 진공포장한 시료의 경우, caking 률이 저장 전에 약 13%에서 저장 후에도 거의 변화가 없이 유지되었다. 진공포장하지 않고 수분활성도 0.81에서 저장한 경우는 저장기간이 길어질수록 caking 률이 증가하였는데, 1주차에 약 66%까지 증가해 이후 약 84%까지 증가하였다. 이는 수분활성도가 높은 환경, 즉 습도가 높을수록 분말이 공기 중의 수분과 접촉이 많아져 덩어리가 생기게 되기 때문인 것으로 사료된다. 녹차분말의 제품 유통시 진공포장 하는 것이 상대습도가 높은 환경에서도 흡습이 일어나지 않아 분말 고유의 상태를 유지시키는데 매우 적합하다고 생각된다.

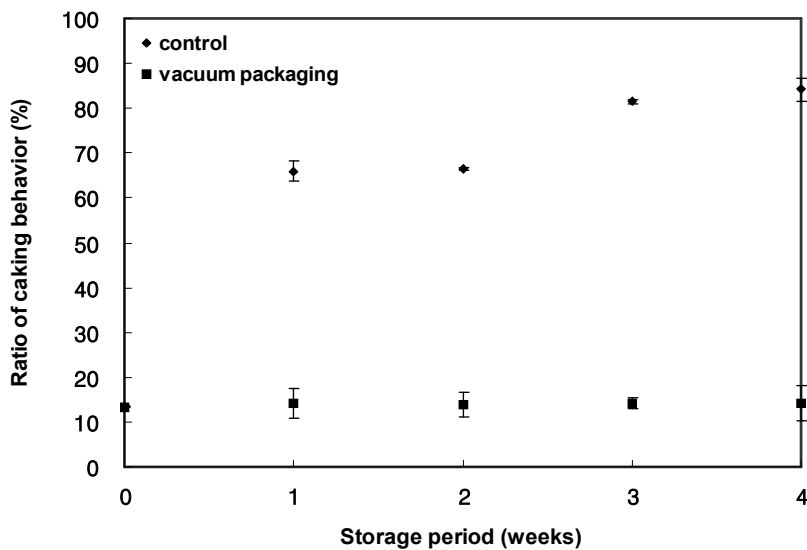


Fig. 1-22. Change in caking index of green tea powder during storage as a function of vacuum packaging. Control: without vacuum packaging.

(나) Tapping test에 의한 부피 감소율 측정

녹차분말을 진공포장하였을 때, 1차년도 연구결과에서 나타난 저장성이 가장 낮은 환경인 수분활성도 0.81에서 저장하는 동안에 나타나는 진공포장의 효과를 분석하기 위해 물리적 특성을 분석하는 측정 방법 중 하나인 tapping test를 이용하여 부피 감소율을 분석하여 Fig. 1-23에 나타내었다. 녹차분말을 진공포장 한 후 4주 동안 저장하는 동안 부피 감소율을 tapping test를 통해 측정한 결과, 진공포장한 시료의 경우, 저장 전의 시료와 거의 차이가 나지 않았다. 하지만, 진공포장하지 않고 저장한 시료의 경우는 같은 중량의 경우 부피가 크게 증가하여 tapping 초기의 부피 감소율이 높게 나타났다. 이는 상대습도가 높은 환경에서 흡습으로 인해 녹차분말 간의 공극이 커져 부피가 늘어났기 때문으로 사료된다.

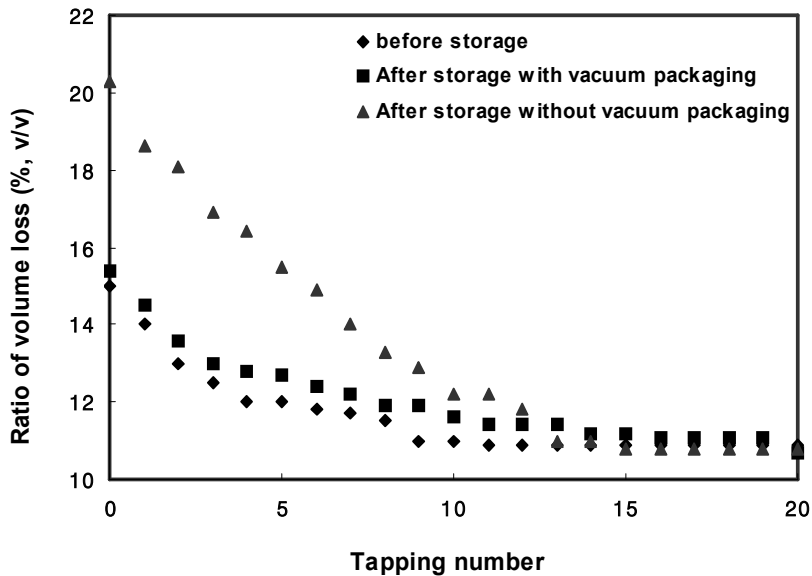


Fig. 1-23. Change in volume loss of green tea powder during storage as a function of vacuum packaging. Control: without vacuum packaging.

라. 녹차분말 음료의 물리화학적 특성 및 저장 안정성

(1) 녹차분말 음료의 제조과정

녹차분말 음료의 제조과정은 Fig. 1-24에 나타낸바와 같이 녹차원료의 입고, 보관, 분쇄, 계량, 혼합, 균질화, 살균, 포장, 후 살균의 순서로 진행된다. 그리고 각 공정별 내용은 Table. 1-13에 나타내었다.

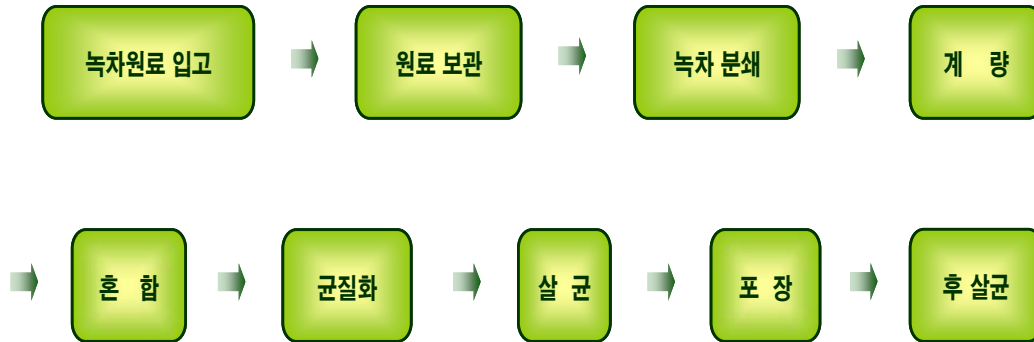


Fig. 1-24. 녹차분말 음료의 제조 공정순서도

Table 1-13. 공정별 가공방법 및 공정설명

단위공정	공정설명
녹차 원료입고	원료적합기준치 마련(미생물오염도조사, 중금속, 성분분석)
원료보관	냉장보관(0~5℃), 냉동보관(-18℃이하)
녹차 분쇄	100mesh로 분쇄
계량	원료를 제품규격에 맞게 계량
혼합	재료: 녹차분말, xanthan gum,, 구연산, 꿀, 설탕, 카라멜 시럽, 소금
균질화	homogenizer를 이용해 혼합액 균질화
살균	121℃, 15분
포장	
후 살균	121℃, 15분
제품보관	상온저장, 유통기한(3개월 이내)

(2) 녹차분말 음료의 외관

Fig. 1-25에 녹차분말 현탁액을 사진촬영한 결과를 나타내었다. 대조구의 경우 분말이 침전되어 투명한 상태를 보이는 반면, 처리구의 경우는 분말입자가 침전되지 않고, 분산된 상태로 유지되어 불투명한 현탁액의 상태를 유지하였다.

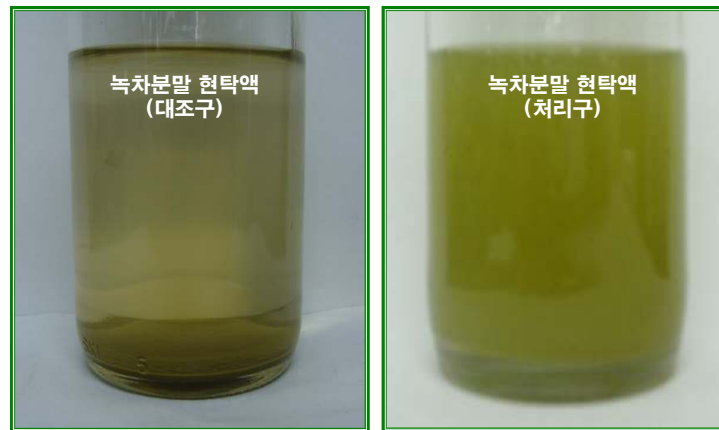


Fig. 1-25. Beverage produced using green tea powder. 1: before storage 2: after storage after 2 weeks

(3) 녹차분말 음료의 색도

녹차분말 음료의 저장에 따른 색도의 변화를 Fig. 1-26에 나타내었다. 처리구의 경우는 L, a, b-value 모두 저장에 따른 변화가 나타나지 않았지만, 대조구의 경우는 L-value가 저장에 따라 증가하였고, a-value는 녹색도가 약간 감소함을 알 수 있었고, b-value는 변화가 거의 나타나지 않았다. 이는 처리구의 경우 저장하는 동안 분말의 분산 상태가 유지되기 때문에 색도의 변화가 나타나지 않지만, 대조구의 경우는 저장하는 동안 분말이 침전되어 투명한 상태가 되기 때문에 색도에 있어서 L-value가 높아지고, a-value의 녹색도가 감소하게 된 것으로 생각된다.

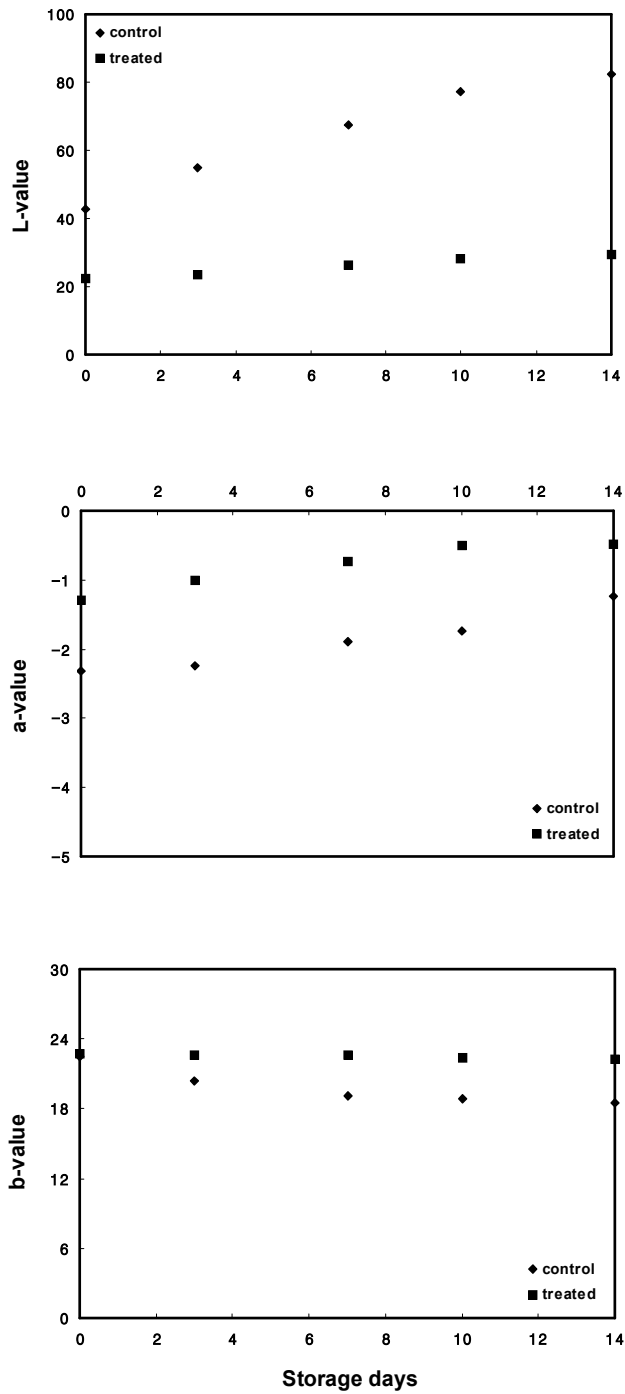


Fig. 1-26. Changes in color value of beverage produced using green tea powder during storage.

(4) 녹차분말 음료의 항산화 활성

녹차분말 음료의 저장에 따른 항산화 활성의 변화를 분석하기 위해 DPPH radical scavenging activity, ABTS⁺ radical scavenging activity, reducing power를 측정하여 Fig. 1-27 ~ 29에 나타내었다. 대조구와 처리구 모두 저장하는 동안 DPPH와 ABTS⁺ 라디칼에 대한 소거 활성과 reducing power (환원력)의 변화가 거의 나타나지 않았다. 따라서 녹차분말을 이용해 현탁액 상태의 음료제품으로 가공하더라도 분산효과를 통해 녹차 고유의 항산화 활성을 유지할 수 있으리라 판단된다.

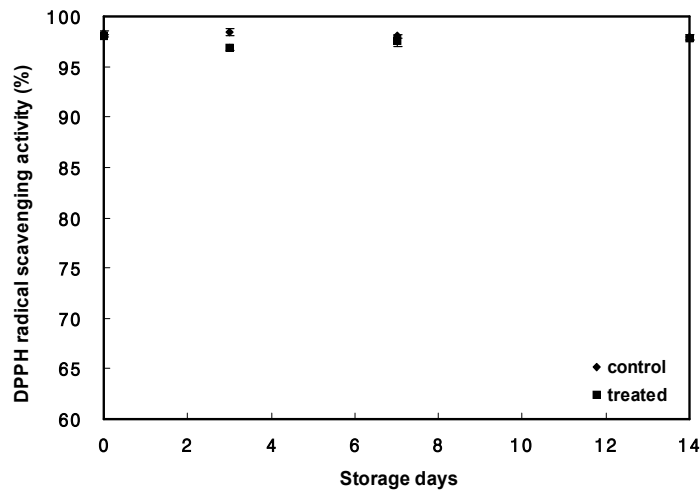


Fig. 1-27. Changes in DPPH radical scavenging activity of beverage produced using green tea powder during storage.

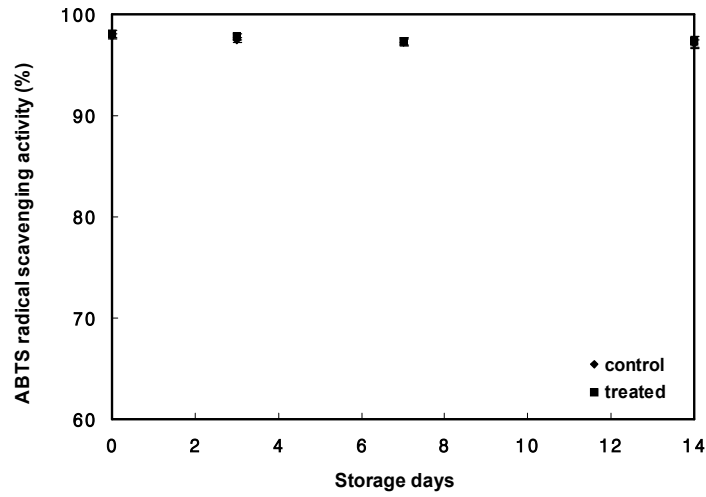


Fig. 1–28. Changes in ABTS⁺ radical scavenging activity of beverage produced using green tea powder during storage.

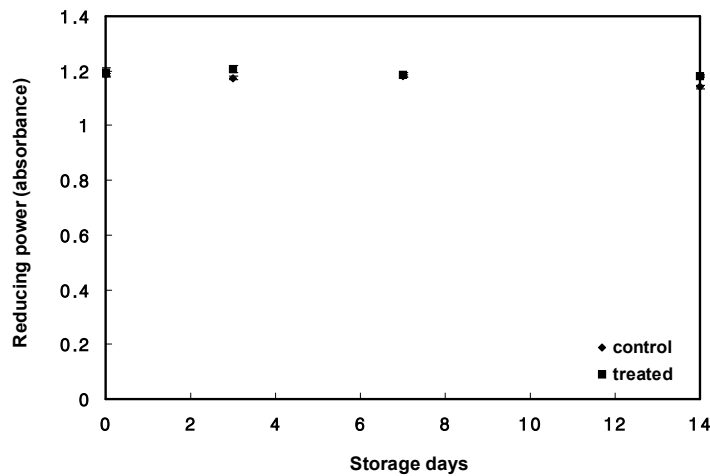


Fig. 1–29. Changes in reducing power of beverage produced using green tea powder during storage.

마. 감마선 및 원적외선 처리에 따른 녹차 침출액의 저장 안정성

(1) 가용성 고형분 함량

감마선 조사와 원적외선 처리에 따른 녹차 침출액의 저장 안정성을 분석하기 위해 녹차를 감마선 조사와 원적외선 처리한 후 70°C에서 3분간 침출하여 4주동안 저장하면서 가용성 고형분 함량을 측정하였다(Fig. 1-30). 처리하지 않은 시료의 침출액과 감마선 조사, 원적외선 처리한 경우 모두 약 36~37%로 차이가 거의 나타나지 않았으며, 저장기간에 따라서도 변화가 나타나지 않았다. 감마선 조사와 원적외선 처리가 녹차에 함유된 가용성 고형분의 추출수율 증가에는 영향을 주지 않은 것으로 사료된다.

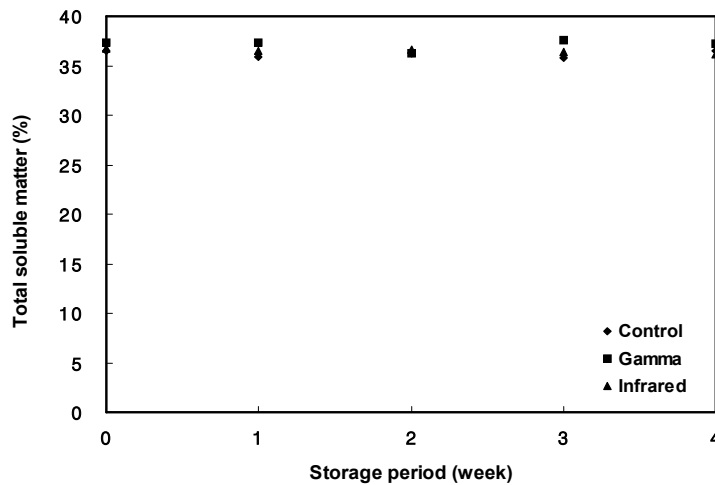


Fig. 1-30. Total soluble matter of green infusion during storage as a function of treatment with infrared and gamma irradiation.

(2) 항산화 활성

감마선 조사와 원적외선 처리한 녹차시료를 이용해 70°C에서 3분간 추출하여 준비한 녹차 침출액의 항산화 활성을 분석하기 위해 4주간 저장하는 동안 DPPH radical scavenging activity, ABTS⁺ radical scavenging activity, reducing power를 측정하였다(Fig. 1-31 ~ 33). DPPH radical scavenging activity의 경우 저장하기 전에 감마선 조사한 경우는 94.1%, 그리고 원적외선 처리한 경우는 94.06%로 나타나 94.35%인 대조구와 차이가

나타나지 않았다. 또한 저장에 따른 변화도 거의 나타나지 않았다. ABTS⁺ radical scavenging activity, reducing power도 마찬가지로 감마선 조사와 원적외선 처리에 따른 차이는 나타나지 않았으며, 저장에 따른 변화도 나타나지 않았다.

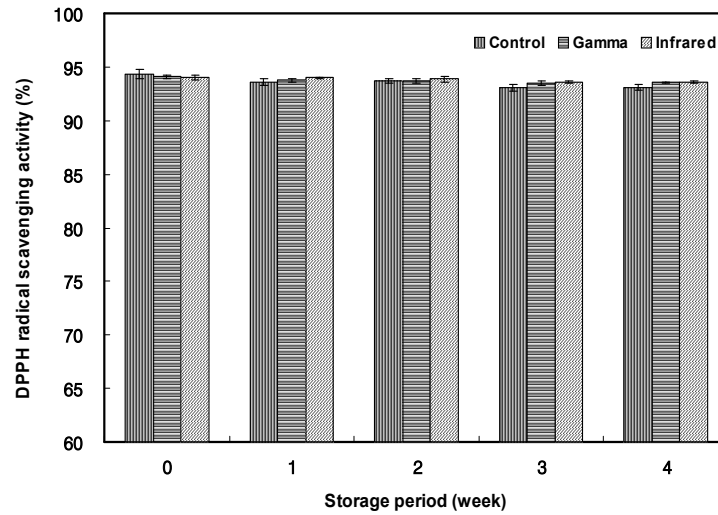


Fig. 1-31. DPPH radical scavenging activity of green infusion during storage as a function of treatment with infrared and gamma irradiation.

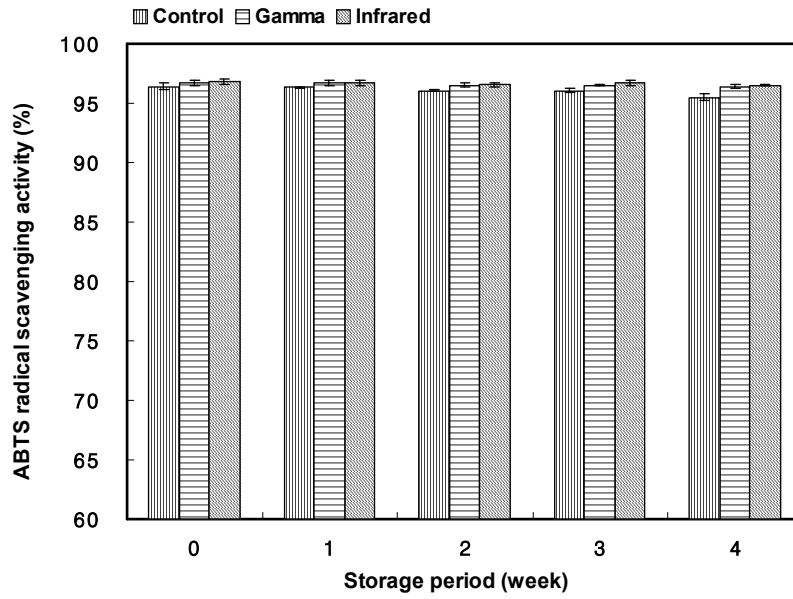


Fig. 1–32. ABTS⁺ radical scavenging activity of green infusion during storage as a function of treatment with infrared and gamma irradiation.

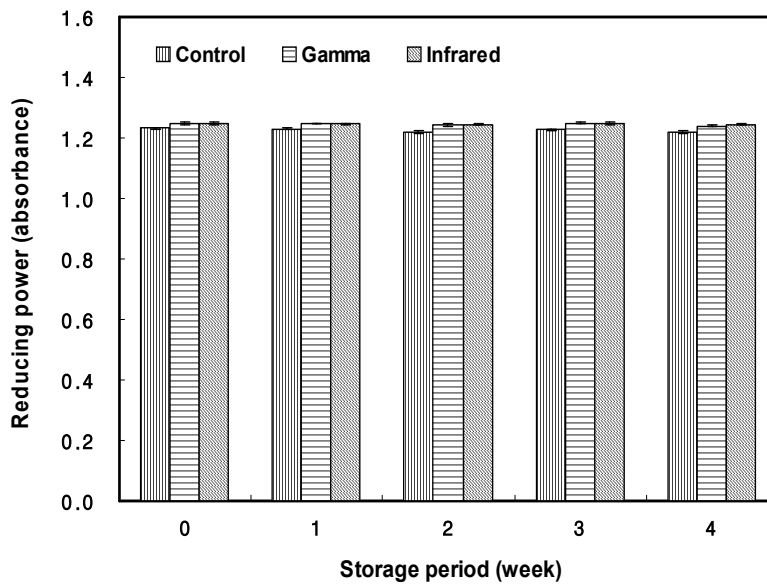


Fig. 1–33. Reducing power of green infusion during storage as a function of treatment with infrared and gamma irradiation.

바. 초음파 추출법에 의한 녹차 유용성분의 추출법 개선

(1) 가용성 고형분 함량

초음파 추출이 녹차의 유용성분의 추출에 영향을 미치는지 알아보기 위해 40, 60℃와 같은 온도에서 초음파 추출하여 가용성 고형분의 함량을 측정하여 Fig. 1-34에 나타내었다. 40℃와 60℃에서 가용성 고형분 함량이 각각 31, 34%로 나타났고, 이에 비해, 초음파 추출하였을 때는 각각 약 36%와 39%로 나타났다. 초음파 추출로서 가용성 고형분의 추출이 약 5% 증가됨을 알 수 있었다. 결론적으로 초음파 추출이 녹차의 유용성분의 추출 효율을 개선시키는 것으로 판단된다.

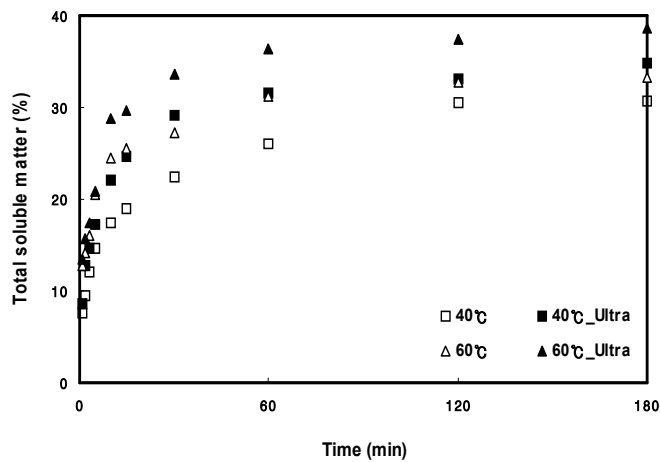


Fig. 1-34. Extraction yield of total soluble matter infused at 40℃ and 60℃ using green tea leaves with/without ultrasonic treatment.

(2) Catechins 함량

녹차의 유용물질인 카테킨의 추출법을 개선하기 위해 여러 온도조건과 초음파 추출법을 이용해 녹차 침출액의 제조하여 각 조건별로 카테킨 성분의 함량을 분석하였다. 침출조건에 따른 녹차침출액의 catechin류 함량의 변화는 Table 1-14~18에 나타내었다. 먼저, 중요한 결과는 초음파 추출에 의한 카테킨 성분의 추출효율증가로 설명할 수 있겠다. 60°C에서 초음파 추출할 경우 60°C와 비교해 모든 종류의 카테킨 함량이 증가하였다. 따라서 초음파 추출법을 이용해 녹차의 추출시 동일온도에서 유용물질을 효율적으로 얻을 수 있을 것으로 사료된다. 녹차에 함유된 카테킨류는 화학구조가 열에 불안정하기 때문에 이와같이 녹차의 관능적 특성을 높이는 음용온도에 가까운 저온에서 초음파 추출로서 추출효율을 높일 수 있다는 것은 매우 유용한 연구 성과라고 판단된다. 녹차침출액 중의 카테킨류 함량은 EGCg, EGC, ECg, EC, (+)catechin의 순으로 함유되어 있었고, 침출온도와 시간이 증가함에 따라 함량은 증가하였다. 그리고 침출온도 40°C와 90°C에서 1분 침출시 catechin류의 함량을 비교해 보면 EGCg의 경우 4.56 mg/g에서 11.92 mg/g으로 약 3배 정도 높게 나타났다. 따라서 catechin류는 온도와 시간 모두 영향을 받는 것을 확인하였다. 그러나 EGCg의 함량을 침출온도 40~90°C에서 침출시간 30, 60min 두 조건을 비교해 보면 각각 4.81, 4.78, 5.20, 10.23, 5.09 mg/g에서 5.04, 5.14, 4.57, 9.42, 4.89 mg/g으로 침출온도 40, 60°C에서는 침출시간이 증가할수록 함량도 증가하였으나, 침출온도 60°C초음파, 80, 90°C에서는 감소하였다. 또한 EGC의 함량도 5.51, 5.92, 6.22, 6.35, 5.16 mg/g에서 5.81, 5.93, 4.88, 5.14, 3.78 mg/g으로 EGCg와 같은 경향을 보였다. 이는 catechin류의 화학구조가 열에 약한 구조를 가지고 있어 침출과정 중 산화되어 함량이 감소하는 것으로 추정된다. 그리고 침출조건에 따른 녹차침출액의 caffeine 함량 변화는 Table 1-19과 같다. caffeine의 경우 침출온도, 시간이 증가함에 따라 함량이 증가하는 경향을 나타내었다. 따라서 caffeine은 온도와 시간에 의존적인 것을 확인하였다. 결론적으로 약 60°C의 저온에서 초음파 추출법을 이용할 경우 유용성분의 추출 효율을 높일 수 있으리라 판단된다.

Table 1–14. Changes in EGC contents of green tea infusions as a function of temperatures and times

(Unit : mg/g)

Time (min)	40°C	60°C	60°C (ultrasonic)	80°C	90°C
1	2.31±0.05 ^{cD}	3.71±0.18 ^{cC}	3.76±0.15 ^{cC}	4.10±0.02 ^{dB}	4.78±0.08 ^{cA}
5	3.62±0.07 ^{bD}	4.75±0.09 ^{bC}	6.31±0.60 ^{aA}	5.63±0.13 ^{bB}	6.07±0.23 ^{aAB}
30	5.51±0.07 ^{aC}	5.92±0.28 ^{aB}	6.22±0.03 ^{aAB}	6.35±0.39 ^{aA}	5.16±0.00 ^{bC}
60	5.81±0.60 ^{aA}	5.93±0.06 ^{aA}	4.88±0.42 ^{bB}	5.14±0.08 ^{cB}	3.78±0.23 ^{dC}

Results are expressed as means ± SD.

Values in the same column with different superscript small letters are significantly different ($P < 0.05$). $a > b > c > d$. Values in the same row of each infusion time with different superscript capital letter are significantly different ($P < 0.05$). $A > B > C > D$

Table 1–15. Changes in (+)-catechin contents of green tea infusions as a function of temperatures and times

(Unit : mg/g)

Time (min)	40°C	60°C	60°C (ultrasonic)	80°C	90°C
1	0.28±0.00 ^{cC}	0.47±0.02 ^{cA}	0.48±0.03 ^{cA}	0.43±0.01 ^{cB}	0.51±0.01 ^{dA}
5	0.48±0.02 ^{bC}	0.53±0.01 ^{cC}	0.68±0.06 ^{bB}	0.71±0.04 ^{bB}	0.83±0.04 ^{cA}
30	0.67±0.08 ^{aC}	0.69±0.05 ^{bC}	0.97±0.03 ^{aB}	1.02±0.08 ^{aB}	1.30±0.00 ^{bA}
60	0.65±0.03 ^{aD}	0.78±0.02 ^{aC}	0.77±0.08 ^{bC}	1.06±0.02 ^{aB}	1.52±0.09 ^{aA}

Results are expressed as means ± SD.

Values in the same column with different superscript small letters are significantly different ($P < 0.05$). $a > b > c > d$. Values in the same row of each infusion time with different superscript capital letter are significantly different ($P < 0.05$). $A > B > C > D$

Table 1–16. Changes in EGCG contents of green tea infusions as a function of temperatures and times

(Unit : mg/g)

Time (min)	40°C	60°C	60°C (ultrasonic)	80°C	90°C
1	4.56±0.61 ^{cd}	8.54±0.39 ^{dc}	8.94±0.39 ^{dc}	9.66±0.05 ^{dB}	11.92±0.26 ^{dA}
5	6.98±0.20 ^{bd}	11.65±0.19 ^{cC}	16.29±0.13 ^{cB}	16.41±0.79 ^{cB}	19.58±0.55 ^{bA}
30	12.78±0.19 ^{aE}	17.48±0.61 ^{bd}	22.23±0.10 ^{aB}	23.52±0.19 ^{aA}	21.34±0.03 ^{aC}
60	13.38±0.17 ^{aC}	20.04±0.45 ^{aA}	18.93±0.46 ^{bB}	19.87±0.38 ^{bA}	18.37±0.12 ^{cB}

Results are expressed as means ± SD.

Values in the same column with different superscript small letters are significantly different (P< 0.05). a> b >c >d. Values in the same row of each infusion time with different superscript capital letter are significantly different (P< 0.05). A> B> C >D >E

Table 1–17. Changes in EC contents of green tea infusions as a function of temperatures and times

(Unit : mg/g)

Time (min)	40°C	60°C	60°C (ultrasonic)	80°C	90°C
1	0.60±0.01 ^{cd}	0.92±0.03 ^{dc}	0.99±0.05 ^{cB}	1.07±0.01 ^{cA}	1.11±0.01 ^{bA}
5	0.97±0.01 ^{bC}	1.12±0.02 ^{cC}	1.52±0.13 ^{bAB}	1.41±0.04 ^{bB}	1.71±0.25 ^{aA}
30	1.41±0.05 ^{aB}	1.41±0.04 ^{bB}	1.90±0.01 ^{aA}	1.84±0.29 ^{aA}	1.94±0.00 ^{aA}
60	1.44±0.13 ^{aC}	1.57±0.08 ^{aBC}	1.58±0.22 ^{bABC}	1.85±0.05 ^{aA}	1.73±0.15 ^{aAB}

Results are expressed as means ± SD.

Values in the same column with different superscript small letters are significantly different (P< 0.05). a> b >c >d. Values in the same row of each infusion time with different superscript capital letter are significantly different (P< 0.05). A> B> C >D

Table 1–18. Changes in ECG contents of green tea infusions as a function of temperatures and times

(Unit : mg/g)

Time (min)	40°C	60°C	60°C (ultrasonic)	80°C	90°C
1	0.90±0.02 ^{dD}	2.12±0.08 ^{dC}	2.10±0.05 ^{cC}	2.43±0.01 ^{dB}	2.89±0.04 ^{cA}
5	1.70±0.03 ^{cE}	2.88±0.06 ^{cD}	3.85±0.34 ^{bC}	4.38±0.22 ^{cB}	5.03±0.04 ^{bA}
30	2.92±0.35 ^{bC}	4.23±0.40 ^{bB}	5.98±0.03 ^{aA}	6.06±0.27 ^{aA}	5.73±0.00 ^{aA}
60	3.42±0.26 ^{aC}	5.11±0.18 ^{aAB}	4.49±0.75 ^{bB}	5.34±0.11 ^{bA}	5.05±0.36 ^{bAB}

Results are expressed as means ± SD.

Values in the same column with different superscript small letters are significantly different (P< 0.05). a> b >c >d. Values in the same row of each infusion time with different superscript capital letter are significantly different (P< 0.05). A> B> C >D >E

Table 1–19. Changes in caffeine contents of green tea infusions as a function of temperatures and times

(Unit : mg/g)

Time (min)	40°C	60°C	60°C (ultrasonic)	80°C	90°C
1	1.40±0.00 ^{bC}	1.49±0.01 ^{dB}	1.52±0.07 ^{cAB}	1.56±0.02 ^{cA}	1.58±0.03 ^{cA}
5	1.42±0.10 ^{bD}	1.62±0.01 ^{cC}	1.69±0.03 ^{abBC}	1.74±0.04 ^{bAB}	1.84±0.05 ^{aA}
30	1.70±0.02 ^{aB}	1.71±0.08 ^{bB}	1.81±0.00 ^{aA}	1.82±0.06 ^{aA}	1.85±0.00 ^{aA}
60	1.79±0.13 ^{aAB}	1.83±0.01 ^{aA}	1.62±0.08 ^{cC}	1.67±0.01 ^{bBC}	1.74±0.05 ^{bABC}

Results are expressed as means ± SD.

Values in the same column with different superscript small letters are significantly different (P< 0.05). a> b >c >d. Values in the same row of each infusion time with different superscript capital letter are significantly different (P< 0.05). A> B> C >D

(3) 총 phenol성 화합물

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 물질로, 다양한 구조와 분자량을 가지며, 이것들의 phenolic hydroxyl가 단백질처럼 거대분자와 결합을 하여 항산화, 항균, 항암 등의 생리기능을 가지는 것으로 보고되고 있으며 특히 녹차에 다량으로 함유되어 있다. 녹차침출액의 총 페놀성 화합물 함량은 Table 1-20에 나타내었다. 결론적으로는 카테킨의 경우와 마찬가지로 총 페놀성 화합물도 초음파 추출로서 추출효율을 높일 수 있는 것으로 나타났다. 침출온도 60℃에서 초음파 추출하였을 때, 초음파 추출하지 않은 경우보다 약 1.1배 정도 함량이 높게 나타났다. 역시 초음파 추출법으로서 녹차의 관능적 특성이 높은 침출온도에서 여러 생리기능을 가지는 총 페놀성 화합물의 추출수율을 높일 수 있기 때문에 관능적 특성과 기능성을 동시에 만족시킬 수 있을 것으로 판단된다. 침출온도 80℃에서 60분 침출 시 145.87 mg/g으로 최대치를 나타내었다. 침출온도 40℃와 80℃를 비교 한 결과 30.04 mg/g, 93.04 mg/g으로 약 3배 정도 높은 함량을 나타내었다.

Table 1-20. Changes in total phenolic contents of green tea infusions as a function of temperatures and times

(Unit : mg/g)

Time (min)	40℃	60℃	60℃ (ultrasonic)	80℃	90℃
1	30.04±1.50 ^{cD}	61.39±9.76 ^{cC}	74.14±1.85 ^{dB}	93.04±2.22 ^{cA}	74.32±1.09 ^{cB}
5	45.35±5.97 ^{bC}	97.50±3.58 ^{bB}	110.68±4.92 ^{cA}	110.02±3.65 ^{bA}	101.34±8.50 ^{bAB}
30	82.77±2.54 ^{aD}	115.55±4.61 ^{aC}	125.79±4.08 ^{bB}	136.28±6.71 ^{aA}	132.99±4.76 ^{aAB}
60	91.73±7.52 ^{aD}	121.79±3.29 ^{aC}	133.28±4.04 ^{aB}	145.87±7.76 ^{aA}	141.52±2.43 ^{aAB}

Results are expressed as means ± SD.

Values in the same column with different superscript small letters are significantly different (P < 0.05). a > b > c > d. Values in the same row of each infusion time with different superscript capital letter are significantly different (P < 0.05). A > B > C > D

(4) Flavonol류

Flavonoid계 성분은 항산화, 항암 등의 기능성을 가진 특유성분으로 알려져 있다. 녹차침출액에 함유되어 있는 flavonol류의 함량을 분석한 결과는 Table 1-21~23과 같다. 녹차침출액의 flavonol류의 함량은 myricetin, quercetin, 및 kaempferol 모두 침출온도와 시간이 증가함에 따라 함량이 증가하는 것을 확인하였다. 그리고 침출온도 90℃에서 60분 침출하였을 경우 12.06, 26.55, 17.05 mg/100g로 가장 높은 함량을 나타내었고, 추출보조 공정인 초음파 처리에 의해 침출온도 60℃에서 비교 하였을 경우 침출 시간 60분에서 myricetin은 4.77 mg/100g에서 9.94 mg/100g, quercetin은 10.97 mg/100g에서 20.84 mg/100g, kaempferol은 7.95 mg/100g에서 17.33 mg/100g으로 약 2배 이상 높은 함량을 나타내었다. 따라서 기호성이 높은 저온에서 추출보조 공정으로 초음파 처리에 의해 flavonol류의 함량을 증가 시키는 것을 확인하였다.

Table 1-21. Changes in myricetin contents of green tea infusions as a function of temperatures and times

(Unit : mg/100g)

Time (min)	40℃	60℃	60℃ (ultrasonic)	80℃	90℃
1	2.22±0.26 ^c	1.19±0.30 ^c	2.13±0.18 ^d	6.07±0.11 ^d	4.72±0.47 ^d
5	4.65±0.24 ^b	3.54±0.09 ^b	3.16±0.05 ^c	8.05±0.26 ^c	6.46±0.31 ^c
30	5.55±0.01 ^a	4.94±0.68 ^a	4.87±0.68 ^b	11.41±0.18 ^a	10.04±0.98 ^b
60	5.26±0.49 ^a	4.77±0.22 ^a	9.94±0.49 ^a	9.98±0.69 ^b	12.06±0.24 ^a

Results are expressed as means±SD

^{a-d} Means in the same column with different superscripts are significantly different (P<0.05). a> b >c >d.

Table 1–22. Changes in quercetin contents of green tea infusions as a function of temperatures and times

(Unit :
mg/100g)

Time (min)	40°C	60°C	60°C (ultrasonic)	80°C	90°C
1	5.32±0.02 ^c	5.85±0.57 ^c	5.98±0.56 ^d	15.07±0.53 ^d	11.42±1.02 ^d
5	7.96±0.64 ^b	8.50±0.30 ^b	7.61±0.16 ^c	17.93±1.28 ^c	14.81±1.11 ^c
30	13.05±0.67 ^a	11.31±1.13 ^a	11.01±0.84 ^b	24.16±0.94 ^a	21.41±1.42 ^b
60	12.42±1.24 ^a	10.97±0.25 ^a	20.84±0.32 ^a	21.36±1.24 ^b	26.55±0.90 ^a

Results are expressed as means±SD

^{a-d} Means in the same column with different superscripts are significantly different (P<0.05). a> b >c >d.

Table 1–23. Changes in keampferol contents of green tea infusions as a function of temperatures and times

(Unit : mg/100g)

Time (min)	40°C	60°C	60°C (ultrasonic)	80°C	90°C
1	3.71±0.02 ^c	3.83±0.51 ^c	4.11±0.70 ^c	10.89±0.39 ^d	8.18±0.53 ^d
5	5.62±0.45 ^b	6.00±0.61 ^b	5.21±0.21 ^c	12.19±0.62 ^c	9.79±0.45 ^c
30	8.85±0.36 ^a	8.21±0.67 ^a	7.76±0.69 ^b	15.86±0.61 ^a	12.70±0.54 ^b
60	8.61±0.28 ^a	7.95±0.29 ^a	17.33±0.92 ^a	14.29±0.27 ^b	17.05±0.61 ^a

Results are expressed as means±SD

^{a-d} Means in the same column with different superscripts are significantly different (P<0.05). a> b >c >d.

(5) 유리아미노산

침출조건에 따른 녹차침출액의 유리아미노산 함량의 변화는 Table 1-24과 같다. 침출온도 40℃와 90℃에서 침출시간 1분과 60분을 비교해 보면 theanine은 0.13 mg/g에서 0.20 mg/g, 0.14 mg/g에서 0.20 mg/g, GABA는 0.09 mg/g에서 0.18 mg/g, 0.10 mg/g에서 0.19 mg/g으로 침출 온도에는 영향을 거의 받지 않고 침출시간이 증가함에 따라 함량이 증가하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과로 유리아미노산은 온도보다는 시간에 의존적인 것을 확인하였다.

Table 1-24. Changes of free amino acid contents in green tea infusion as a function of temperatures and times
(unit : mg%)

Free amino acids	Content (mg/g)																			
	40℃				60℃				60℃(ultra)				80℃				90℃			
	1min	5min	30min	60min	1min	5min	30min	60min	1min	5min	30min	60min	1min	5min	30min	60min	1min	5min	30min	60min
Threonine	0.12	0.17	0.20	0.21	0.14	0.21	0.22	0.24	0.13	0.20	0.23	0.24	0.14	0.21	0.21	0.24	0.14	0.21	0.22	0.25
Serine	0.29	0.36	0.47	0.48	0.31	0.45	0.49	0.52	0.30	0.45	0.51	0.52	0.32	0.45	0.51	0.52	0.32	0.47	0.48	0.53
Theanine	0.13	0.18	0.21	0.20	0.15	0.20	0.20	0.21	0.14	0.18	0.20	0.20	0.14	0.18	0.19	0.20	0.14	0.18	0.19	0.20
Asparagine	0.74	0.86	0.99	1.14	0.79	1.03	1.10	1.33	0.81	1.19	1.21	1.25	0.84	1.18	1.19	1.27	0.79	1.29	1.32	1.58
Glutamic acid	0.65	0.88	1.14	1.19	0.77	1.09	1.23	1.25	0.72	0.03	1.16	1.25	0.76	1.07	1.23	1.25	0.80	1.09	1.22	1.24
Proline	0.10	0.12	0.13	0.17	0.11	0.16	0.17	0.18	0.13	0.15	0.17	0.18	0.13	0.17	0.17	0.18	0.12	0.12	0.22	0.24
Glycine	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03
Alanine	0.12	0.17	0.20	0.21	0.14	0.20	0.22	0.22	0.13	0.19	0.22	0.22	0.14	0.20	0.22	0.23	0.15	0.20	0.22	0.24
Valine	0.16	0.21	0.25	0.28	0.18	0.26	0.28	0.31	0.18	0.27	0.30	0.30	0.19	0.26	0.27	0.30	0.18	0.25	0.28	0.35
Cystine	0.04	0.04	0.04	0.05	0.03	0.05	0.06	0.06	0.04	0.05	0.06	0.08	0.04	0.05	0.06	0.07	0.04	0.04	0.06	0.07
Methionine	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03
Isoleucine	0.08	0.10	0.12	0.13	0.09	0.13	0.13	0.15	0.09	0.14	0.14	0.15	0.09	0.12	0.13	0.15	0.09	0.12	0.14	0.18
Leucine	0.12	0.14	0.18	0.19	0.12	0.18	0.19	0.21	0.12	0.19	0.20	0.21	0.13	0.19	0.19	0.22	0.12	0.18	0.20	0.25
Tyrosine	0.08	0.12	0.15	0.16	0.09	0.15	0.16	0.18	0.09	0.14	0.18	0.19	0.10	0.15	0.17	0.18	0.09	0.15	0.15	0.20
Phenylalanine	0.11	0.16	0.19	0.20	0.13	0.20	0.21	0.25	0.13	0.20	0.23	0.24	0.14	0.20	0.20	0.24	0.13	0.19	0.21	0.28
GABA	0.09	0.14	0.17	0.18	0.10	0.15	0.17	0.18	0.10	0.13	0.17	0.18	0.10	0.14	0.17	0.19	0.10	0.13	0.17	0.19
Lysine	0.12	0.17	0.25	0.27	0.15	0.23	0.27	0.32	0.15	0.26	0.29	0.31	0.14	0.24	0.28	0.30	0.16	0.25	0.25	0.36
Histidine	0.05	0.08	0.11	0.11	0.07	0.10	0.12	0.14	0.07	0.11	0.12	0.12	0.06	0.10	0.12	0.13	0.07	0.10	0.11	0.15
Arginine	1.32	2.00	2.98	3.04	1.74	2.74	3.12	3.36	1.72	2.84	2.95	3.22	1.84	2.83	3.00	3.09	1.82	2.80	3.19	3.33
Total	4.34	5.94	7.82	8.25	5.14	7.57	8.39	9.17	5.09	6.76	8.39	8.92	5.34	7.78	8.36	8.81	5.30	7.82	8.69	9.70

사. 고기호성 녹차음료 추출조건 확립

(1) 추출조건에 따른 녹차 침출액의 총 질소화합물 함량

일반적으로 기호성이 높은 고품질 녹차의 경우 특유의 쓴맛이나 떫은 맛보다 단맛이나 감칠맛 등의 순한 맛이 우세하다. 따라서 고기호성 녹차음료의 제조에 있어서 이점이 매우 중요하다. 녹차의 쓴맛이나 떫은 맛외에 단맛과 감칠맛 등의 순한맛과 깊은 관계가 있는 요소는 총 질소화합물의 함량이다. 따라서 고기호성 녹차음료의 제조시 이 총질소화합물이 높게 나타나는 조건을 확립하기 위해 추출조건에 따른 녹차 침출액의 총질소 화합물을 측정된 결과, Table 1-25과 같이 80℃에서 가장 높게 나타났고, 시간에 따라서는 3 min에서는 1.42%, 15 min에서는 2.05%로 증가하다가 그 후 감소하여 60 min에서는 1.66%로 나타났다.

Table 1-25. Total nitrogen contents of green tea infusions as a function of temperatures and times

Time (min)	(Unit : %)					
	40℃	60℃	80℃	90℃	40℃ (ultrasonic)	60℃ (ultrasonic)
3	0.64±0.03 ^{dE}	0.83±0.05 ^{dD}	1.42±0.02 ^{bA}	1.30±0.01 ^{bB}	0.83±0.04 ^{dD}	0.95±0.00 ^{cC}
5	0.68±0.01 ^{dD}	0.91±0.04 ^{dCD}	1.63±0.23 ^{bA}	1.32±0.09 ^{bAB}	0.87±0.01 ^{dCD}	1.13±0.29 ^{bcBC}
10	0.90±0.03 ^{cD}	1.14±0.01 ^{cC}	1.66±0.00 ^{aA}	1.44±0.01 ^{abB}	1.19±0.02 ^{cC}	1.08±0.15 ^{cC}
15	1.19±0.01 ^{bD}	1.19±0.01 ^{cD}	2.05±0.05 ^{aA}	1.45±0.04 ^{abB}	1.34±0.05 ^{bC}	1.43±0.03 ^{abB}
30	1.35±0.03 ^{aB}	1.44±0.07 ^{bAB}	1.62±0.01 ^{bA}	1.55±0.18 ^{aAB}	1.34±0.01 ^{bB}	1.64±0.02 ^{aA}
60	1.38±0.06 ^{aC}	1.56±0.05 ^{aAB}	1.66±0.00 ^{bA}	1.64±0.02 ^{aA}	1.48±0.05 ^{aB}	1.61±0.01 ^{aA}

Results are expressed as means ± SD.

Values in the same column with different superscript small letters are significantly different ($P < 0.05$). $a > b > c > d$. Values in the same row of each infusion time with different superscript capital letter are significantly different ($P < 0.05$). $A > B > C > D > E$

(2) 추출조건에 따른 녹차 침출액의 총 탄닌 함량

총 탄닌 함량은 차의 색깔, 맛 및 향에 깊이 관여하는 중요한 요소이다. 녹차의 맛에 기초한 관능적 품질에 있어서는 탄닌 성분이 녹차의 쓴맛이나 떫은맛을 높이게 된다. 따라서 고기호성 녹차 음료를 제조에 있어 이 탄닌 성분의 함량이 매우 중요하다고 판단된다. 추출조건에 따른 녹차 침출액의 총 탄닌의 함량을 Table 1-26에 나타내었다. 추출온도중에서 가장 높은 온도인 90°C에서 가장 높게 나타났으며, 3 min에서 60 min까지 4.77~7.99%로 증가하는 추세를 보였다.

Table 1-26. Total tannin contents of green tea infusions as a function of temperatures and times

Time (min)	(Unit : %)					
	40°C	60°C	80°C	90°C	40°C (ultrasonic)	60°C (ultrasonic)
3	0.64±0.03 ^{dE}	0.83±0.05 ^{dD}	1.42±0.02 ^{bA}	1.30±0.01 ^{bB}	0.83±0.04 ^{dD}	0.95±0.00 ^{cC}
5	0.68±0.01 ^{dD}	0.91±0.04 ^{dCD}	1.63±0.23 ^{bA}	1.32±0.09 ^{bAB}	0.87±0.01 ^{dCD}	1.13±0.29 ^{bcBC}
10	0.90±0.03 ^{cD}	1.14±0.01 ^{cC}	1.66±0.00 ^{aA}	1.44±0.01 ^{abB}	1.19±0.02 ^{cC}	1.08±0.15 ^{cC}
15	1.19±0.01 ^{bD}	1.19±0.01 ^{cD}	2.05±0.05 ^{aA}	1.45±0.04 ^{abB}	1.34±0.05 ^{bC}	1.43±0.03 ^{abB}
30	1.35±0.03 ^{aB}	1.44±0.07 ^{bAB}	1.62±0.01 ^{bA}	1.55±0.18 ^{aAB}	1.34±0.01 ^{bB}	1.64±0.02 ^{aA}
60	1.38±0.06 ^{aC}	1.56±0.05 ^{aAB}	1.66±0.00 ^{bA}	1.64±0.02 ^{aA}	1.48±0.05 ^{aB}	1.61±0.01 ^{aA}

Results are expressed as means ± SD.

Values in the same column with different superscript small letters are significantly different ($P < 0.05$). $a > b > c > d$. Values in the same row of each infusion time with different superscript capital letter are significantly different ($P < 0.05$). $A > B > C > D > E$

(3) 추출조건에 따른 녹차 침출액의 N/T value

총 질소 화합물의 함량과 탄닌 함량은 녹차 침출액의 맛의 결정에 매우 중요한 역할을 하게되는 요소이기 때문에, 이 두 함량의 비율이 매우 중요하다. 최근까지의 녹차 연구에서 총 질소 화합물 함량을 탄닌 함량으로 나눈 N/T value를 녹차의 기호성을 판단하는 파라미터로서 이 비율이 높을수록 녹차의 기호성이 높은 것으로 보고되고 있다. 추출조건에 따른 녹차 침출액의 N/T value를 Table 1-27에 나타내었다.

Table 1-27. The ratio of total nitrogen to tannin(N/T value) of green tea infusions as a function of temperatures and times

(Unit : %)

Time (min)	40°C	60°C	80°C	90°C	40°C (ultrasonic)	60°C (ultrasonic)
	3	32.09±1.26 ^a	35.20±3.67 ^a	43.84±0.71 ^a	27.20±1.66 ^b	32.78±0.39 ^b
5	32.48±0.39 ^a	29.96±1.48 ^b	41.19±4.42 ^{bA}	25.86±2.33 ^b	33.18±1.19 ^b	36.39±9.72 ^a
10	36.82±1.26 ^{bA}	31.53±0.07 ^{bA}	42.90±8.84 ^a	23.89±1.24 ^{bA}	33.61±0.26 ^b	28.31±4.46 ^a
15	41.11±0.69 ^a	31.38±0.55 ^{bA}	42.67±2.17 ^a	21.46±1.38 ^a	35.98±0.68 ^a	34.35±0.15 ^a
30	37.90±0.71 ^b	33.29±0.73 ^{bA}	33.20±1.00 ^{bA}	21.04±1.94 ^a	29.11±0.91 ^v	30.21±0.59 ^a
60	33.25±0.06 ^c	29.97±0.00 ^b	30.86±2.39 ^b	20.57±0.38 ^a	28.24±0.82 ^c	30.76±0.24 ^a

Results are expressed as means ± SD.

Values in the same column with different superscript small letters are significantly different (P < 0.05). a > b > c > d. Values in the same row of each infusion time with different superscript capital letter are significantly different (P < 0.05). A > B > C > D > E

(4) 반응표면분석법에 의한 N/T value의 최적화

침출 조건에 따른 총 탄닌 함유량에 대한 총 질소 함유량의 비(N/T)를 반응표면분석에 의해 녹차의 최적침출조건을 살펴보면 Fig. 1-35과 같다. 침출온도가 56~64°C, 침출시간이 18min 미만인 경우 N/T값이 37로 가장 높은 것을 확인하였다. 결론적으로, 고기능성 녹차 음료의 제조에는 56~64°C의 온도에서 약 18분 미만으로 침출하는 것이 가장 적합한 조건인 것으로 판단된다.

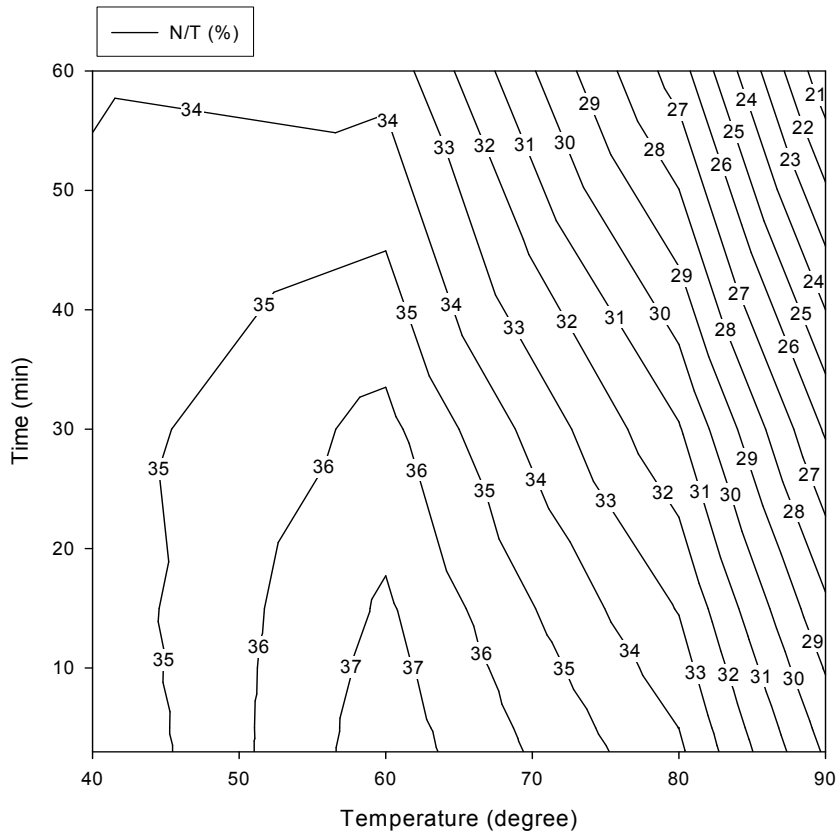


Fig. 1-35. Superimposing contour map of optimization condition about N/T value of green tea infusions as a function of temperatures and times.

제 2 절 녹차제품의 미생물 오염 특성조사 및 녹차성분의 항균작용 구명

1. 연구개발 수행 내용

가. 녹차시료의 조제

잎차는 경남 하동군 악양면에서 재배 중인 재래종(*Camellia sinensis*. var. *sinensis*) 품종을 이용해 전통식 방법으로 덫음차로 제조한 것을 구입하여 4℃ 냉풍건조를 통해 수분활성도 각각 0.81, 0.69 및 0.23으로 맞추어 20℃ 데시케이트에 보관하면서 시료로 사용하였다. 한편, 구입한 덫음차를 분쇄기를 이용하여 분쇄후 100mesh 체를 통해 거른 후 수분활성도 각각 0.81, 0.69 및 0.23으로 맞추어 20℃ 데시케이트에 보관하면서 시료로 사용하였다. 또한, 녹차추출물은 분쇄한 덫음차를 100℃의 water bath에서 3시간동안 추출하여 1차 여과포를 이용하여 여과하였다. 여과액은 10분동안 5,000 rpm에서 원심분리하여 상징액을 수집하고 2차 여과시켜 얻은 액을 Rotary vacuum evaporator(Yamato, Japan)로 최초량의 1/10로 농축하고 동결건조하여 시료를 powder상으로 조제하였다. 물추출시의 최적 조건을 규명하기 위하여 추출온도를 40℃, 60℃, 80℃, 100℃로 구분하여 녹차추출물(Green tea extract : 이하 GTE로 칭함)을 추출하였다.

나. 녹차시료의 일반성분 분석

녹차농가에서 채취한 녹차시료의 일반성분은 AOAC법(AOAC, 2000)에 준하여 수분은 dry oven method, 회분은 직접 회화법, 총질소는 Kjeldahl법, 전당은 Somogyi변법, 지방은 Soxhlet 추출법으로 측정하였다.

다. 저장환경별 녹차시료의 오염미생물의 측정

수분활성도 0.81, 0.69 및 0.23의 잎차와 가루녹차를 20℃ 데시케이터에 보관하면서 4주에 걸쳐 1주 간격으로 총균수 와 대장균 군 및 곰팡이, 효모수를 측정하였다. 저장중인 시료를 5g취하여 stomarchpack 넣은 후 45ml의 멸균수를 가하여 균질화 시켜 1ml를 취하여 필요한 만큼 단계희석하였다.

(1) 총균수

plate count agar (Difco laboratories) 배지 즉 Table 1 과 같은 조성의 배지를 증류수 1 L에 녹여 120℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다. petri dish에 배지를 (약 45℃) 15 ml 정도주입하고 냉각, 응고 시킨 다음, 단계희석액 0.1ml를 도말하여 37℃에서 24시간 동안 배양하여, 형성된 colony의 수를 colony forming unit (CFU/g)로 표시하였다.

Table 2-1. Composition of plate count agar

Component	Content(g)
Pancreatic digest of casein	5
Yeast extract	2.5
Dextrose	1.0
Agar	15

(2) 대장균군

Table 2와 같은 조성의 desoxycholate agar (Difco laboratories) 배지를 증류수 1 L에 녹여 60~70℃에서 중탕으로 녹여 autoclave 시키지 않은 상태로 petri dish 주입하여 총균수 측정과 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.

Table 2-2. Composition of desoxycholate agar

Component	Content(g)
Peptone	10
Lactose	10
Sodium desoxycholate	1
Sodium chloride	5
Dipotassium phosphate	2
Ferric ammonium citrate	1
Sodium citrate	1
Agar	15
Neutra red	0.3

(3) 곰팡이 및 효모의 측정

potato dextrose agar (Difco laboratories) 배지 즉 Table 3과 같은 조성의 배지를 이용하여 총균수의 측정과 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.

Table 2-3. Composition of potato dextrose agar

Component	Content(g)
Potatose, Infusion from 200g	4
Dextrose	20
Agar	15

라. 녹차추출물의 항균력 검사

(1) 공시 균주 및 배지

본 실험에서 녹차추출물의 항균력 검색용 균주는 일반적으로 곡류가공식품, 낙농가공식품, 육가공식품, 수산가공식품 및 기타 발효식품의 변질에 관여하는 부패미생물을 대상으로 하였으며 경상대학교 식품공학과에 보관중이거나 한국중균협회에서 분양받아 실험에 사용하였다. 곰팡이 및 효모는 potato dextrose agar, 세균은 brain heart infusion agar, tryptic soy agar 등의 사면배지에 계대배양하여 4℃에 보관하면서 사용하였다.

(2) 항균력 검사

녹차추출물에 대한 항균력 시험은 paper disc method(Piddock, 1990)에 의해 측정하였다. 즉, 배양된 공시균액 1 ml을 petri dish에 가하고 멸균된 배지를 약 15 ml 부어 혼합하고 굳혀서 그 위에 다시 10 ml을 중첩하여 굳힌다. 그 위에 멸균된 paper disk를 놓고 GTE의 농도를 0, 250, 500, 1000 μ g/ml의 농도로 조제된 액을 10 μ l 흡수시켜 세균의 경우 생육최적온도인 35℃에서 24시간 배양하고, 효모와 곰팡이의 경우는 30℃에서 48시간 배양후, 미생물이 증식하지 못한 clear zone의 직경을 대조구(녹차추출물을 처리하지 않은 것)와 비교하여 항균력을 시험하였다.

(3) 녹차추출물 항균물질의 열 및 pH 안정성 조사

항균활성물질의 열안정성을 측정하기 위하여 녹차추출물을 40℃~150℃에서 30분동안 각각 열처리한 후 시료용액으로 사용하였다. 살균 냉각한

potato dextrose agar 또는 tryptic soy agar배지상에 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 시험용액을 paper disk에 접종하고, disk확산법으로 대조구와 같이 37°C에서 24시간동안 배양하여 공시균주의 생육저해환을 측정·비교하였다. 또한 pH안정성은 무균상태의 완충용액으로 pH 3에서 pH 11까지 조정 한 후, 일정량을 열안정성과 동일한 방법으로 paper disk에 접종하고, 생육저해환을 측정·비교하였다.

(4) 녹차추출물처리에 미생물의 생육저해도 측정

녹차추출물에 함유된 항균물질의 미생물 생육저해 최소농도를 측정하기 위하여 GTE를 membrane filter(0.2 μm)로 제균시키고, tryptic soy broth(TSB)에 녹차추출물을 여러 가지 농도단위로 첨가한 후, 사면배지에서 각 공시균주 1백균이를 취하여 10 ml TSB에 접종, 30°C에서 24시간동안 전배양시키고, 이 배양액 0.1 ml를 취해 상기와 동일한 배양조건으로 계대 배양한 배양액 0.1 ml를 여러 농도의 녹차추출물이 함유된 plate count agar상에 평판도말하고 30°C에서 3일간 배양하여 생존균수를 대조구와 비교·측정하여 미생물의 생육저해정도를 배양시간별로 조사하였다.

마. 미생물 세포막의 기능성에 미치는 녹차추출물의 영향

(1) Scanning electron microscope(SEM)에 의한 녹차추출물 처리전후의 미생물 세포의 형태변화

녹차추출물이 미생물의 세포형태에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Scanning electron microscope(SEM)에 의한 녹차추출물 처리전후의 미생물 세포의 형태변화를 관찰하였다(Bendayan, 1984). 즉, 공시균주를 녹차추출물 무처리구인 대조구와 함께, 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 녹차추출물이 첨가된 각각의 Fraser base broth에서 36~48시간동안 배양한 다음, 배양액 1 ml를 eppendorf tube에 옮긴 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 1 ml의 4% neutral buffered para-formaldehyde(NBP)를 가하여 다시 원심분리한 후 천천히 진탕하면서 2회 세척하였다. 여기에 1 ml의 NBP를 다시 가하여 4°C에서 48시간동안 고정시키고 0.015 M phosphate buffer solution(PBS, pH 7.2)를 1 ml가하고 진탕하면서 2회 세척한 후 무수 알콜로 진탕하여 탈수하고 임계점 건조기로 건조한 후, 대조구와 함께 미생물세포의 형태변화를 관찰하였다.

(2) β -Galactosidase (β -D-galactoside galactohydrolase : EC 3.2.1.23)의 정량
 녹차추출물이 세포막에 미치는 영향을 알아 보기 위하여 세포를 파괴하지
 않고 녹차추출물 존재시에 *Collectotrichum fragariae*의 β -galactosidase 효소
 활성이 정량되는가의 여부를 Miller의 방법(Miller, 1972)에 준하여 살펴보았
 다. *Collectotrichum fragariae*가 β -galactosidase 효소 활성을 나타내는 정도는
 isopropyl- β -D-thiogalactoside(IPTG)와 X-gal(5-bro-mo-4-chloro-3-indolyl-
 β -D-galactoside)을 함유한 배지에서 확인하였다. *Collectotrichum fragariae*
 를 영양배지에서 접종한 뒤 30°C에서 12시간 배양한 후 M9 medium으로 옮
 겨 주고 600 nm에서의 흡광도가 0.5~0.7이 되도록 배양한 다음, 0°C에 방치
 하여 성장을 억제하였다. 배양액 1.5 ml에 같은 부피의 완충용액 [100 mM
 sodium phosphate buffer (pH 7.0), 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄·7H₂O, 50
 mM β -mercaptoethanol]을 가하고, 최종 농도가 3%가 되도록 각각 증류
 수, toluene, acetone, 녹차추출물을 첨가하고, 10초간 세게 흔들어 주었다.
 toluene 제거를 위해 37°C에서 40분간 방치하고 28°C로 옮겨 5분간 더 방치
 한 후, 0.6 ml ONPG(o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, 4mg/ml)을 가하
 여 주었고 28°C에서 18시간 동안 방치하였다. 1M Na₂CO₃ 1.5 ml를 가하여
 반응을 정지시키고, 원심 분리하고 상등액의 흡광도를 420 nm에서 측정하였
 다. 증류수를 넣은 경우를 0으로 하고 toluene을 넣어준 경우를 100으로 하
 여 녹차추출물이 세포막에 미치는 영향을 비교하였다.

바. 항균활성물질의 분리 및 동정

항균력이 탁월한 녹차추출물로부터 항균활성물질을 column
 chromatography를 이용하여 순수하게 분리하고, Nuclear magnetic
 resonance (NMR) spectrophotometer 및 Mass spectrophotometer(MS) 측정
 기에 의하여 항균활성물질의 화학구조를 분리·동정하였다.

사. 녹차추출물의 안전성 검사

전술한 바와 같이 광범위한 범위의 병원성 및 부패성 미생물에 대한 뚜렷
 한 항균성을 보인 녹차추출물은 우수한 생리기능성을 고려할 때, 그 활용범
 위가 검토될 필요가 있다. 녹차추출물을 항균제, 식품보존료, 항균성 의약품,
 수의약품 등으로 사용하기에 앞서, 이 추출물의 안전성 여부를 검사하는 것
 은 당연할 일이 될 것이다. 따라서, 본 연구에서는 녹차추출물의 안전성 검
 사를 이행하고자, 흰쥐를 대상으로 경구 투여시 녹차추출물의 급성경구독성

여부를 알아보려고 하였으며, 또한 토끼를 대상으로 피부와 눈에 대한 국소 독성 여부를 피부자극시험과 안점막 자극시험을 전보(Ko. et al., 1995)의 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다.

(1) 급성 경구 독성 시험

동물실험용 Sprague-Dawley 계 흰쥐 60 마리를 1군당 암수 각각 5마리씩 6군으로 나누어, 1군부터 5군의 흰쥐에게 녹차추출물을 흰쥐 1 kg 당 1.5 g, 3.0 g, 6.0 g, 8.5 g, 12.0 g씩 위관을 통해 각각 투여하였다. 제 6군은 대조군으로 흰쥐 1kg 당 식염수 12.0 g씩을 투여하였다. 약물을 투여하기 18시간 전부터 먹이를 주지 않았다. 약물을 투여한 후 흰쥐들을 암수 및 군별로 사육통에 넣고 실험동물사료를 주어 14일동안 사육하였다. 약물을 투여한 날은 흰쥐를 자주 관찰하여 죽거나 또는 이상한 몸의 자세, 이상한 꼬리의 위치, righting reflex의 소실, 무기력증, 경련, 진전(tremor), 행동의 변화, 수면, 타액 및 눈물 콧물 양의 변화, 배설물 성상의 변화, 먹이 소비량의 변화, 털의 일어섬 등과 같은 전신적인 독성 증상이 나타나는가를 관찰하였다. 다음날부터는 하루에 2번 이상 흰쥐를 관찰하였다. 흰쥐가 죽으면 즉시 무게를 단 후에 부검하여 육안적인 병변이 있는지를 확인하였다. LD₅₀ 와 95%confidence range 는 Litchfield와 Wilcoxon의 방법(Litchfield et al., 1949)으로 계산하였다.

(2) 피부 자극 시험

동물실험용 수컷 흰토끼 6마리의 등쪽 털을 모두 제거하고 약물을 도포할 부위 4군데를 선정하였다. 그 중 한 군데에 녹차추출물 용액(멸균수 2배 희석액) 0.5 mL를 떨어 뜨리고 즉시 가아제를 덮고 약물의 증발을 막기 위해 같은 크기의 비닐로 덮은 다음 테이프로 고정하였다. 또한 한군데는 주사 바늘로 긁어 피가 나지 않은 범위내에서 최대한 깊게 상처를 낸 뒤에 마찬가지로 녹차추출물 용액을 도포하였다. 나머지 두군데는 녹차추출물 대신 식염수를 도포하였다. 24시간 뒤에 비닐과 가아제를 제거하고 약물 도포 부위에 병변이 생겼는지, 생겼다면 얼마나 심한지를 관찰하였다. 그 후 14일간 사육하면서 매일 약물 도포 부위를 관찰하여 병변의 변화 양상을 관찰하였다. 피부 병변의 평가는 국립보건안전연구원 예규 제10호(1988년 10월 29일 제정)의약품 등의 독성시험기준에 의거하였다. 즉, 홍반에 대해서는 홍반이 전혀 없는 경우를 0점, 육안으로 겨우 식별할 정도의 아주 가벼운 홍반

을 1점, 분명한 홍반을 2점, 약간 심한 홍반을 3점, 홍당 무색을 발적을 보이는 심한 홍반을 4점으로 하였다. 부종에 대해서는 부종이 전혀 없는 경우를 0점, 육안으로 겨우 식별할 정도의 아주 가벼운 부종을 1점. 뚜렷하게 부어 올라서 병변부가 분명히 구별될 경우의 가벼운 부종을 2점, 약 1 mm 정도 부어 오르는 정도의 부종을 3점, 1 mm 이상 부어오르고 노출 부위밖에까지 확장된 상태의 심한 부종을 4점으로 하였다.

(3) 안점막 자극시험

동물실험용 흰토끼 9마리중 6마리의 우측 눈에 녹차추출물 용액(2배 희석액) 0.1 mL씩 떨어뜨린 후, 매일 관찰하여 어떠한 병변이 얼마나 심하게 생겼는지를 평가하였다. 좌측 눈은 대조군으로 사용하였다. 나머지 3마리의 우측눈에도 녹차추출물 용액 0.1 mL 떨어뜨린 다음, 물로 1분간 세척하고 마찬가지로 방법으로 관찰하였다. 병변의 평가는 국립보건안전연구원 예규 제 10호 의약품 등의 독성시험기준에 의거하였다. 즉, 각막 혼탁정도에 대해서는 화농이나 혼탁이 없는 경우를 0, 분산 또는 밀집된 혼탁이 있으나 홍채의 말단이 명확히 관찰되는 경우를 1, 반투명한 부분이 쉽게 관측되며 홍채의 말단이 약간 불명확 경우를 2, 각막이 진주빛이며 홍채의 말단이 관찰되지 않고 동공의 크기가 가까스로 관측되는 정도를 3, 각막이 불투명하여 홍채가 관찰되지 않는 경우를 4로 하고, 혼탁된 각막의 범위에 대해서는 1/4이하를 1, 1/4이상 1/2미만을 2, 1/2이상 3/4 미만을 3, 3/4 이상을 4로 하여 각막 혼탁 정도를 A, 혼탁의 범위를 B로 할때 각막의 병변을 $A \times B \times 5$ 로 점수화 하였다. 홍채에 대해서는 정상을 0, 현저한 주름이나 충혈, 종창이 있으나 빛에 대한 반응이 있는 경우를 1, 출혈이나 심한 파괴가 관찰되거나 빛에 대한 반응이 없는 경우를 2로 하여 여기에 5를 곱한 값을 홍채 병변의 점수로 하였다. 결막의 발적에 대해서는 발적이 없는 경우를 0, 몇몇 혈관이 명확히 충혈된 경우를 1, 넓은 심홍색 색조를 보이는 경우를 2, 옅은 선홍색으로 변한 경우를 3으로 하고, 결막의 부종에 대해서는 부종이 없는 경우를 0, 약간의 종창이 있는 경우를 1, 안검의 부분적 외전을 동반한 현저한 종창이 있는 경우를 2, 눈이 반쯤 감길 정도의 안검의 종창이 있는 경우를 3, 눈이 반 이상 감길 정도의 종창이 있는 경우를 4로 하고, 배출물에 대해서는 배출물이 없는 경우를 0, 약간의 배출물이 있는 경우를 1, 속눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물이 있는 경우를 2, 눈주위의 상당 부위를 적시는 배출물이 있는 경우를 3으로 하여, 발적의 정도를 A, 결막 부종의 정도를 B, 배출물의 정도를 C로

할때 결막의 병변을 $(A+B+C) \times 2$ 로 점수화 하였다. 눈에 대한 녹차추출물의 독성은 위와같이 계산된 각막, 홍채, 결막 병변의 점수를 모두 더한 값으로 하였다.

아. 농축수산 식품소재 및 가공식품에 대한 GTE의 처리효과

(1) 처리 방법

(가) 농산물

서부경남지역 농장에서 수확 또는 판매하는 배추, 단무지, 샐러드 등의 채소류를 구입하여 수도수로 세척하여 불순물을 제거하고 $5^{\circ}\text{C} \sim 10^{\circ}\text{C}$ 에서 냉장하면서 실험재료로 이용하였다. 대조구의 경우, 수세한 채소류를 직접 저온저장하고, GTE 처리구의 경우, GTE $500 \sim 1,000 \mu\text{g/ml}$ 용액에서 5분 \sim 10분간 침지시켜 물기를 제거한 후 냉장시킨 후, 각각 대조구와 함께 polyethylene film 포장에 넣어 밀봉하여 $10^{\circ}\text{C} \sim 15^{\circ}\text{C}$, 상대습도 55%~75%인 실내에서 일정기간 보관하면서 외관 및 오염된 총균수를 측정하였다.

(나) 축산물 및 수산물

경남 진주교외지역 도살장에서 구입한 구상으로 마쇄한 소고기에 GTE 농도 $500 \sim 1,000 \mu\text{g/ml}$ 용액에서 수 분간 침지처리한 후, GTE를 처리하지 않은 대조구와 동시에, 각각 별도의 polyethylene film 피막의 plastic 상자에 포장하여 냉동실에 보관하였다가, 처리실험시마다 꺼내어, 10°C 내외로 유지되는 저온실에 보관하면서 오염된 대장균수를 측정하였다. 수산물 식품원료인 멸치를 경남 삼천포시 어시장에서 직접 구입하여, 축산물 식품원료와 동일한 방법과 조건으로 처리하여 보관하면서 외관상 및 미생물학적 부패 정도를 검토하였다.

(다) 농산물 및 수산물 가공제품

경남지역에서 그 원료를 생산하고 있는 농산물 및 수산물의 가공식품인 두부 및 어묵을 GTE용액으로 처리하여 부패미생물의 오염방지 및 살균효과를 도모하고 가공식품의 지방산패를 억제하여 가공제품의 신선도를 유지할 목적으로 GTE의 적용방법 및 농도수준을 결정하는 실험을 실시하였다. 즉, 두부와 어묵을 전문적으로 취급하는 상점에서 구입하여, $500 \sim 1,000 \mu\text{g/ml}$ 농도의 GTE 용액에 침지시킨 후 실온에서 방치하면서, 가공품의 외관상 품질을 비교·검토하거나 제품 중 존재하는 오염미생물의 총 균수를 측정하여 GTE의

적용 가능성과 보존효과를 비교하였다.

(2) 오염총균수의 측정

농수산물 식품원료 및 그 가공식품의 시료를 대조구와 함께, 일정한 농도의 GTE 용액으로 처리하여 식품별로 일정기간 저장하는 도안 오염된 세균의 총 균수를 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 일정한 저장기간별로 각 식품을 stomacher를 사용하여 멸균한 일정량의 buffer용액으로 침출한 후, plate count agar 고체배지(Difco제품)에 접종하고 다음과 같이 처리하여 실험하였다. 즉, 배지를 증류수 1L에 녹여 120°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 멸균배지에 앞에서 침출한 세균 희석용액 1 ml를 넣고 배지를 (약 45°C) 15 ml 정도 주입하고 혼합하여 냉각, 응고 시킨 다음, 세균균의 비전형적인 colony 형성을 방지하기 위하여, 동일한 배지를 3~4 ml정도 첨가하여 이중층을 만들었다. 배지를 냉각, 응고시킨 후 거꾸로 뒤집어서 37°C에서 20시간 동안 배양하여, 배지상에 나타난 세균의 총균수를 측정하였다. 이때 GTE를 첨가하지 않은 대조구 침출액도 동일한 방법으로 고체배지에 접종하여 세균의 총균수를 측정하였다.

2. 연구개발 수행 결과

가. 녹차시료의 일반성분

시중에 판매되는 덕음차의 일반성분 분석결과 Table 2-4와 같이 나타났다. 덕음 녹차의 수분함량은 1.36%로서 나타내었다. 조회분의 함량은 13.23%로 나타내었다. 조지방은 2.67%였으며, 조단백질은 37.25%로 나타났고, 탄수화물은 37.28%로 가장 높게 나타내었다. 조섬유는 8.21%로 나타내었다. 본 실험결과에서 녹차의 수분함량은 Lee 등(1998)의 3.3~3.9%에 비하여 다소 낮은 편이었는데 본 실험에 사용한 덕음 녹차의 경우 덕음과 건조의 횟수에 따른 수분 손실에 의한 것으로 생각된다. 단백질 함량은 Lee 등(1998)이 한국산 녹차에서 전질소 함량을 3.1~3.8%로 보고하여 상당한 차이를 나타내었다. Lee 등(2004)은 채엽시기에 따라 전질소 함량이 3.87~6.27%로 어린잎에 질소 함량이 높다고 보고하였으며, Kim 등(2004)은 녹차의 총 아미노산 함량이 1.2~4.5%로 채엽 시기가 늦을수록 감소하는데 특히 어린잎일수록 아미노산 중 theanine이 많이 함유되어 녹차의 맛이 좋은 것으로 보고하였다. 한편, Jeon과 Park(1999)은 전질소 함량을 6.08~6.60%로 보고하였는데 녹차의 덕음 횟수에 따른 차이는 큰 영향이 없는 것으로 보고하였다.

Table 2-4. Proximate composition of roast green tea (% w/w)

	Moisture	Crude ash	Crude fat	Crude protein ¹⁾	Carbohydrate ²⁾	Crude fiber
Roast green tea	1.36±0.01 ³⁾	13.23±0.00	2.67±0.92	37.25±0.03	37.28±3.69	8.21±0.49

¹⁾N × 6.25.

²⁾100 - sum of moisture, crude protein, crude lipid and crude ash contents.

³⁾mean±S.D.

나. 저장환경별 녹차시료의 오염미생물의 변화

(1) 총균수

경남 하동군 악양면의 햇차원에서 제조한 잎차 및 분말 녹차를 20°C에서 수분활성도 0.81, 0.69 및 0.23에서 4주 동안 저장 중 미생물학적 변화를 관찰한 결과 총균수의 경우 Table 2-5와 같이 나타내었다. 수분활성도 0.81의 경우 저장 1주부터 $10^{2.40}$ 으로 나타나기 시작 하였으며, 저장 4주째는 $10^{2.39}$ 으로 나타났다. 수분활성도 0.69의 경우 저장 2주째에서만 $10^{1.2}$ 으로 검출되었고, 수분활성도 0.23의 경우 저장 1주째에서만 $10^{2.95}$ 으로 검출되었으며, 이후 저장기간 동안 전혀 검출되지 않았다. 녹차분말의 경우 수분활성도 0.81의 경우 저장 1주부터 $10^{2.18}$ 으로 나타났으며, 저장 4주에서는 $10^{2.30}$ 으로 나타내었다. 수분활성도 0.69의 경우 저장 1주째 $10^{2.0}$ 으로 나타내었다. 수분활성도 0.23의 경우 저장 1주에서만 $10^{2.0}$ 으로 나타났으며, 이후 저장기간 동안 전혀 검출되지 않았다. 총균수의 경우 저장 1주째 6개의 시료중 5개에서 검출된 반면 수분활성도 0.69와 0.23은 이후에서 총균수가 검출되는 횟수가 적었다. 즉, 수분활성도 0.81에서만 4주의 저장기간 동안 비슷한 수치의 총균수가 꾸준히 검출되었다. 따라서 수분활성도 조절에 따른 미생물의 생육억제를 도모할 수 있는 것으로 나타내었다.

Table 2-5. Change of total bacteria cell number[log₁₀ CFU/g] in storage water activity during the preservation period at 20°C.

Water activity	Storage period(weeks)				
	1	2	3	4	
잎차	0.81	2.40	2.1	1.67	2.39
	0.69	-	1.2	-	-
	0.23	2.95	-	-	-
녹차분말	0.81	2.18	1.80	-	2.30
	0.69	2	-	-	2
	0.23	2	-	-	-

- : Not detected.

(2) 대장균 군

대장균 선택배지 desoxycholate agar을 이용하여 대장균의 검출결과 Table 2-6과 같이 나타내었다. 각각의 수분활성도 0.81, 0.69 및 0.23의 모두에서 4주간의 저장 기간중 대장균 군은 전혀 검출되지 않았다.

Table 2-6. Change of *E. coli* form cell number[log₁₀ CFU/g] in storage water activity during the preservation period at 20°C.

Water activity	Storage period(weeks)				
	1	2	3	4	
잎차	0.81	-	-	-	-
	0.69	-	-	-	-
	0.23	-	-	-	-
녹차분말	0.81	-	-	-	-
	0.69	-	-	-	-
	0.23	-	-	-	-

- : Not detected.

(3) 곰팡이 및 효모

곰팡이 및 효모를 검출할 수 있는 선택배지 Potato Dextrose agar을 이용하여 검출한 결과 Table 2-7과 같이 나타내었다. 잎차의 경우 수분활성도 0.69에서 저장 4주째 처음으로 10^{2.0}의 곰팡이·효모가 검출 되었으며, 수분활성도 0.23에서도 저장 4주째 10^{2.39}으로 검출되었다. 분말녹차의 경우, 수분활성도 0.69에서 저장 1주째에서만 10^{1.79}으로 나타내었다.

Table 2-7. Change of yeast-mold cell number[log₁₀ CFU/g] in storage water activity during the preservation period at 20°C.

Water activity		Storage period(weeks)			
		1	2	3	4
잎차	0.81	-	-	-	-
	0.69	-	-	-	2
	0.23	-	-	-	2.39
녹차분말	0.81	-	-	-	-
	0.69	1.79	-	-	-
	0.23	-	-	-	-

- : Not detected.

(4) 진공포장한 녹차시료의 오염미생물 변화

녹차시료(잎차, 녹차분말)를 포장봉투에 일정량을 넣고 진공포장기(주. 인트라이즈 제품 AIRZERO 노즐식 진공포장기, 경기도 안산시)의 실링바로 눌러 압착한 후, 콘트롤 박스의 MODE 버튼을 눌러 진공가스충진, 접착 등 각 기능으로 작업전환이 이루어지도록 하여 2달 동안 저온 및 상온 저장하면서 오염미생물의 경시적 변화를 측정하였으나, 포장이후 전혀 변화를 보이지 않았다. 따라서, 차후 지속적인 실험을 수행하여 이와같은 결과를 확인하고자 한다.

(5) 녹차 음료의 저장중 오염미생물 변화

녹차 침출액을 4°C와 18°C의 온도 조건하에서 28일간 저장하면서 미생물학적 변화를 실험한 결과 Table 2-8과 같이 나타내었다. 상온저장의 경우 저장 2일부터 총균수가 20으로 나타났으며, 저장 7일 이후의 경우, 75로 증가되었다. 효모곰팡이의 경우, 저장 14일간 저장하는 동안 전혀 검출되지 않았다. 한편, 4°C정도의 저온에서 저장할 경우, 2일부터 총균수가 5로 검출되었으며, 저장 14주일에는 30로 증가하였다. 효모곰팡이의 경우, 상온에서 저장한 경우와 마찬가지로 저장 14일에서도 전혀 검출되지 않았다. 대장균의 경우, 상온저장과 저온저장 모두에서 검출되지 않았다. 본 실험의 경우, 총균수만 미량 검출되었는데 수치는 매우 낮았으며, 식품위생학적 위해요인이 될 수 범위의 미생물이 검출되었다고 할 만큼의 유의적인 결과는 아니었다. 침출액의 경우, 70°C에서 침출하였기 때문에 온도에 의한 살균 효과와 함께 저장시 미생물학적 위험요소를 제거한다면 상당기간 저장효과를 볼 수 있을 것으로 판단된다.

Table 2-8. Changes of viable cell count for green tea extraction drink of during storage at 4°C and 30°C for 4 weeks

(Unit : CFU/ml)

S.P. ¹⁾	Storage condition					
	Nomal temperature storage (18°C)			Low temperature storage (4°C)		
	Total bacterialcount	Yeast. mold	Coliform	Total bacterialcount	Yeast mold	Coliform
0	ND ²⁾	ND	ND	ND	ND	ND
1	2×10	ND	ND	0.5×10	ND	ND
2	1×10	ND	ND	0.7×10	ND	ND
3	1×10	ND	ND	1.0×10	ND	ND
5	1.5×10	ND	ND	1.5×10	ND	ND
7	7×10	ND	ND	2.5×10	ND	ND
10	7.5×10	ND	ND	2.0×10	ND	ND
14	7.5×10	ND	ND	3.0×10	ND	ND

1) : Storage period

2) : Not Detection

다. GTE의 조제 및 항균특성

(1) GTE의 조제 및 추출 수율

뒤음차를 건조된 상태로 구입하여 추출·농축하고 동결건조기로 건조하여 조제한 GTE의 추출 수율은 다음 Table 2-9, 2-10 및 2-11과 같다.

(가) 분쇄의 영향

시료를 분쇄 하였을 경우 시료의 추출 수율에 미치는 영향을 알아보기 위해 잎차 시료를 100mesh의 크기로 분쇄한 시료의 추출수율을 측정해 Table 2-9와 같이 나타내었다. 100°C의 단일온도에서 추출하였을 때 추출수율이 다음과 같이 분말화 한 경우는 21.30%로 나타났으며, 잎차의 경우 19.08%로 나타내었다. 따라서 분말화 하여도 유의적인 효과는 보이지 않았다.

Table 2-9. Effect of pulverizing on extraction yield of green tea

(Unit:%)

Condition	Raw	Powder
Extraction yield	19.08	21.30

(나) 추출온도별 물 추출물의 수율

GET의 추출시 추출온도에 따른 추출수율의 변화를 살펴보기 위하여 증류수를 원료중량의 9배가 되게 한 다음 40°C, 60°C, 80°C, 100°C로 추출온도

를 달리하여 3시간동안 추출하여 추출수율을 측정한 결과 Table 2-10과 같이 나타내었다. 즉, 40℃에서는 9.57%로 나타났으며, 60℃는 10.41% 90℃의 경우는 15.34%로 나타났고, 100℃의 경우는 19.08%로 가장 높은 추출 수율을 보였다. 따라서 추출 온도가 높을수록 추출 수율이 높아지는 것을 관찰할 수 있으며, 최적의 추출온도는 100℃로 설정할 수 있다.

Table 2-10. Extraction yields of Green tea by using various different temperature of water

(Unit : %)				
Temperature	40℃	60℃	80℃	100℃
Extraction yield	9.57	10.41	15.34	19.08

(다) 용매별 추출 수율

녹차를 추출, 농축하고 건조하여 조제한 녹차의 추출 수율은 Table 2-11과 같다. 즉, 녹차의 용매별 추출수율은 물에서 19.08%로 가장 높았고, butanol 15.16%, ethanol 12.12%, acetone 0.84%, ethyl ether 0.84% 순으로 나타났다. 따라서, 수율이 높고 항균력이 뛰어난 물추출물(수용성 GTE)을 본 실험의 항균성 시료로 사용하였다.

Table 2-11. Extraction yields of green tea by using various solvents

(Unit : %)					
Solvent	Distilled water	Butanol	acetone	Ethanol	Ethyl ether
Extraction yields	19.08	15.16	0.84	12.12	0.84

(2) GTE의 항균특성

(가) 수용성 GTE의 항균작용

GTE의 항균력을 측정하기 위하여 공시균주에 대하여 수용성 GTE의 농도를 0(Control), 250, 500, 1000 µg/ml으로 처리하여 측정하였다. paper disk 법에 의한 미생물의 생육저해환을 측정한 결과는 Fig. 2-1과 같다. 즉, 전반적으로 GTE 500 µg/ml 이상의 농도에 침지 처리한 paper disk 주위에는 균의 증식이 억제되는 clear zone을 형성함으로써 GTE의 항균력을 뚜렷하게 관찰할 수 있었다. GTE는 Gram양성균, Gram음성균, 효모 및 곰팡이 등 넓은 영역의 미생물에 대하여 뚜렷한 생육저해환을 보여 항균작용이 우수한 것으로 나타났다. 아울러, 이들은 공시균주에 대해서는 농도에 비례하여 항균력이 증가하는 것을 알 수 있었다.

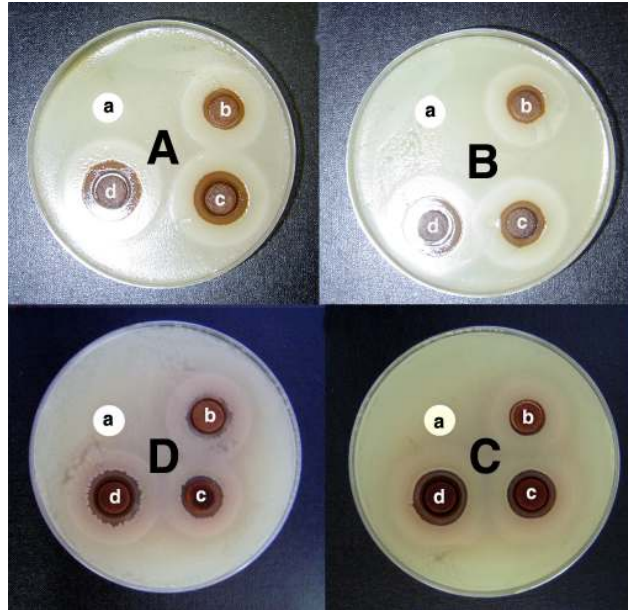


Fig. 2-1. Inhibition effect of green tea extract at different concentration on the growth of microorganisms.

A: *Staphylococcus aureus*

B: *Escherichia coli*

C: *Saccharomyces cerevisiae*

D: *Fusarium oxysporum*

a : Control b: 250 µg/ml c: 500 µg/ml d: 1,000 µg/ml

(나) 추출용매별 항균작용

5가지 서로 다른 용매를 사용하여 추출한 녹차의 항균력 실험결과는 Table 2-12와 같다. 즉, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 에 대해 용매별 효과는 물추출물에서 가장 강한 생육 저해환을 보였고, 다음으로 ethanol, butanol 순으로 나타났다. Park 등 (1992)은 20종의 한약재를 다른 용매로 추출시, 추출용매나 시료에 따라 항균력의 차이를 나타낸다고 하였다. 녹차의 경우 물추출물이 가장 강한 항균력을 보여, 실생활에서 끓는 물에 녹차를 우려내어 음용하는 시음 습관은 항균효과면에서 이상적인 것으로 생각된다.

Table 2-12. Growth inhibition zone of microorganisms by green tea extract from various solvents.

Solvent	Growth inhibition zone(mm) of microorganisms	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Water	18 mm	17 mm
Butanol	13 mm	13 mm
Ethanol	14 mm	13 mm
Acetone	11 mm	10 mm
Ether	10 mm	10 mm

(3) 저장환경별 녹차추출물의 항균작용

녹차시료(잎녹차와 분말녹차)를 20℃, 수분활성도가 각각 0.23, 0.69 및 0.81로 유지되는 저장실에서 4주간 저장하면서, 저장기간과 수분활성도에 따른 녹차시료의 항균력을 paper disk법에 의한 생육저해환의 크기로 비교한 결과, 잎녹차의 경우가 분말녹차보다 다소 항균력이 높은 것으로 나타났고, 저장4주째까지는 저장기간별 녹차시료의 항균력은 뚜렷한 차이를 보이지 않았으며, 수분활성도가 낮을수록 잎녹차와 분말녹차 모두 항균력이 높은 것으로 나타났으나, 결론적으로 추론해 보면, 주어진 실험범위에서의 저장기간과 수분활성도에 따라 녹차시료의 항균력은 유의적인 차이를 보여 주지 않았다. 따라서, 이와 관련된 연구는 계속 검토해 보아야 할 것으로 생각된다.

(4) 기존 항균제와 녹차추출물의 항균력 비교

멸균하여 미리 건조시킨 brain heart infusion agar에 각 세균의 24시간 배양액 100 µl를 평판도말한 후 GTE 2,000 µg/ml(0.2%상당), sodium benzoate 및 potassium sulfate 각각 2% 용액을 직경 10 mm의 paper disk에 60 µl씩 주입하여 확산시킨 후 37℃에서 48시간 배양했을 때, 생육 저해환의 크기를 비교하였다. Fig. 2-2는 *Escherichia coli* 와 *Sacharomyces cerevisiae*에 대하여 GTE에 의해 형성된 생육저해환의 크기를 보존료(sodium benzoate, potassium sulfate)와 비교한 결과이다. 즉 GTE(0.2%)의 생육저해환은 2%의 보존료의 생육저해환보다 더 크고 뚜렷한 생육저해환을 나타내었다. 따라서 GTE는 천연 항균제 또는 보존료로서의 이용 가능성을 가지고 있는 것으로 판단되었다.

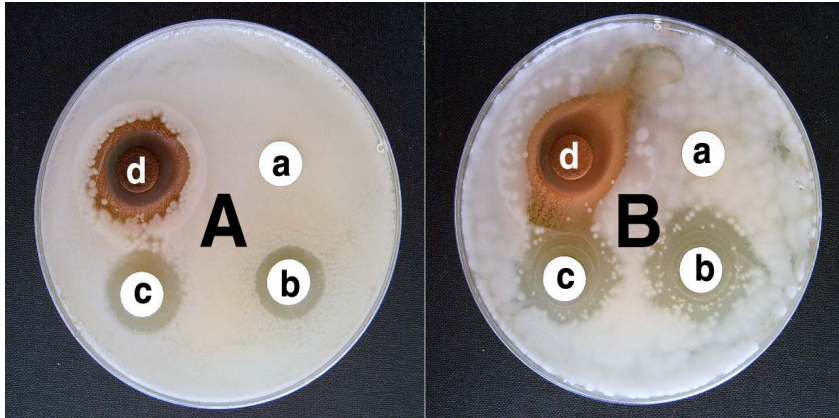


Fig. 2-2. Comparison of inhibitory zone by the green tea extracts and sodium benzoate and potassium sulfate against.

A : *Escherichia coli*

B : *Sacharomyces cerevisiae*

a : Control b : sodium benzoate(2%) c : potassium sulfate(2%)

d : GTE(0.2%)

(5) 녹차추출물의 젖산균의 생육에 미치는 효과

GTE가 유산균의 생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 멸균된 Lactobacilli MRS 배지에 계대 배양한 유산균주를 단독균주로 하여 접종 도 말한 후 GTE를 농도별(250 µg/ml, 500 µg/ml, 1,000 µg/ml)로 하여 paper disk에 분주 하여 30°C incubation에 배양한 후 paper disk 주위의 생육 저해환을 관찰 하였다. GTE가 유산균 생육에 미치는 영향은 Fig. 2-3과 같이 나타났다. *Lenconostoc citreum*과 *Lactobacillus plantarum*에서 각기 농도를 다르게 하여 GTE를 paper disk에 분주 후 생육저해환을 비교한 결과, GTE가 배지를 착색 하였으나, paper disk 주위의 생육 저해환은 나타나지 않았다. 녹차에 함유된 polyphenol 중에서 신체 조절 및 생리 활성 작용을 나타내는 주요 성분은 catechin인 것으로 알려져 있다. Wee와 Park(1997)은 녹차엽에서 분말 형태로 차엽 catechin을 조제하여 김치 산패에 관여하는 미생물을 대상으로 항미생물 활성을 검정한 결과, *Leuconostoc mesenteriodes*, *Lactobacillus plantarum* 및 *Pediococcus cerevisiae*에 대해서는 2 mg/ml 첨가 수준, *Streptococcus faecalis*는 4 mg/ml 첨가 수준, *Lactobacillus brevis*는 5 mg/ml 첨가 수준에서부터 균의 생육이 억제되기 시작하였으나 *Saccharomyces cerevisiae*에 대한 생육억제 효과는 낮았다고 하였다. 또한

Park 등도(2001) 김치의 발효에 주도적인 역할을 하는 유산균인 *Leuconostoc* sp.와 *Lactobacillus* sp.가 녹차 분말 0.5% 첨가에 의해 발효 속성 중 전반적인 유산균수가 적고 증가 폭도 적었다고 보고하였다. 한편 Jung 등(2005)의 가루녹차 첨가에 의한 유산균의 영향에 대한 보고에 따르면, 가루녹차 첨가는 배양 초기에는 유산균의 생육에 큰 영향을 미치지 않았으며 오히려, 배양 9시간부터 가루녹차 첨가에 의한 유산균의 증식 촉진 효과가 타나나는 것으로 보고하고 있다. 본 실험 결과에서도 일정시간 배양중에는 녹차추출물에 의해 김치 유산균의 생육이 억제되지 않는 것으로 나타났으며, 김치 유산균 등의 장내 유용미생물은 GTE에 의한 생육 저해 효과가 뚜렷하지 않은 것으로 판단되었다.

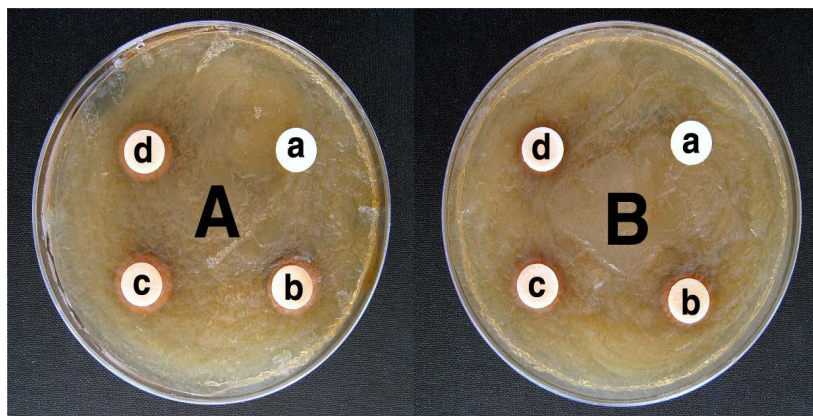


Fig. 2-3. Inhibition effect of green tea extract at different concentration on the growth of lactic acid bacteria

A: *Leuconostoc citreum* (ATCC 49370) B: *Lactobacillus p(ATCC14917)*
a : Control b: 250 µg/ml c: 500 µg/ml d: 1,000 µg/ml

라. GTE의 미생물 생육저해 농도곡선측정

GTE의 공시 균주에 대한 생육저해 최소농도를 확인하기 위하여 측정한 생육저해 농도곡선은 Fig. 2-4와 같다. 즉, *Staphylococcus aureus*에서는 250 µg/ml 이상에서 생육이 완전히 억제되는 것으로 나타났으며, *Esherichia coli* 및 *Fusarium oxysporum*에서 각각 100 µg/ml 및 500 µg/ml 이상에서 거의 생육이 억제되는 것으로 나타났다.

마. 항균물질의 열 및 pH 안정성

녹차추출물이 함유하는 항균물질의 열 및 pH의 안정성을 측정한 결과 Fig. 2-5 및 Fig. 2-6과 같다. 즉, 열안정성 실험결과는 Fig. 2-5에서 보는 바와 같이, *Escherichia coli*의 생육저해환의 지름은 전처리 온도범위에서 관계없이 생육저해환의 직경이 17 mm정도로 일정하였고, *Staphylococcus aureus*의 경우에도 전처리온도에 관계없이 약 16 mm로 일정하여 광범위한 처리온도범위에서 녹차추출물의 뚜렷한 항균력을 나타냈다. 그리고 녹차추출물의 항균성분의 pH안정성은 Fig. 2-6에서 보는 바와 같이 넓은 pH범위 (pH 3~11)에서 동일한 크기의 생육저해환을 나타내어 pH안정성을 보였으며, *Escherichia coli*의 생육저해환의 지름은 약 18 mm정도로 전처리 pH에 관계없이 일정하였고, *Staphylococcus aureus*의 경우, 생육저해환의 지름은 약 16 mm정도로 전처리 pH에 관계없이 일정하게 나타나 녹차추출물의 항균활성물질은 넓은 pH범위에서 안정하였다. 따라서 녹차를 원료로 한 가공식품에 대해서 뚜렷한 항균효과 및 저장효과를 기대할 수 있었다.

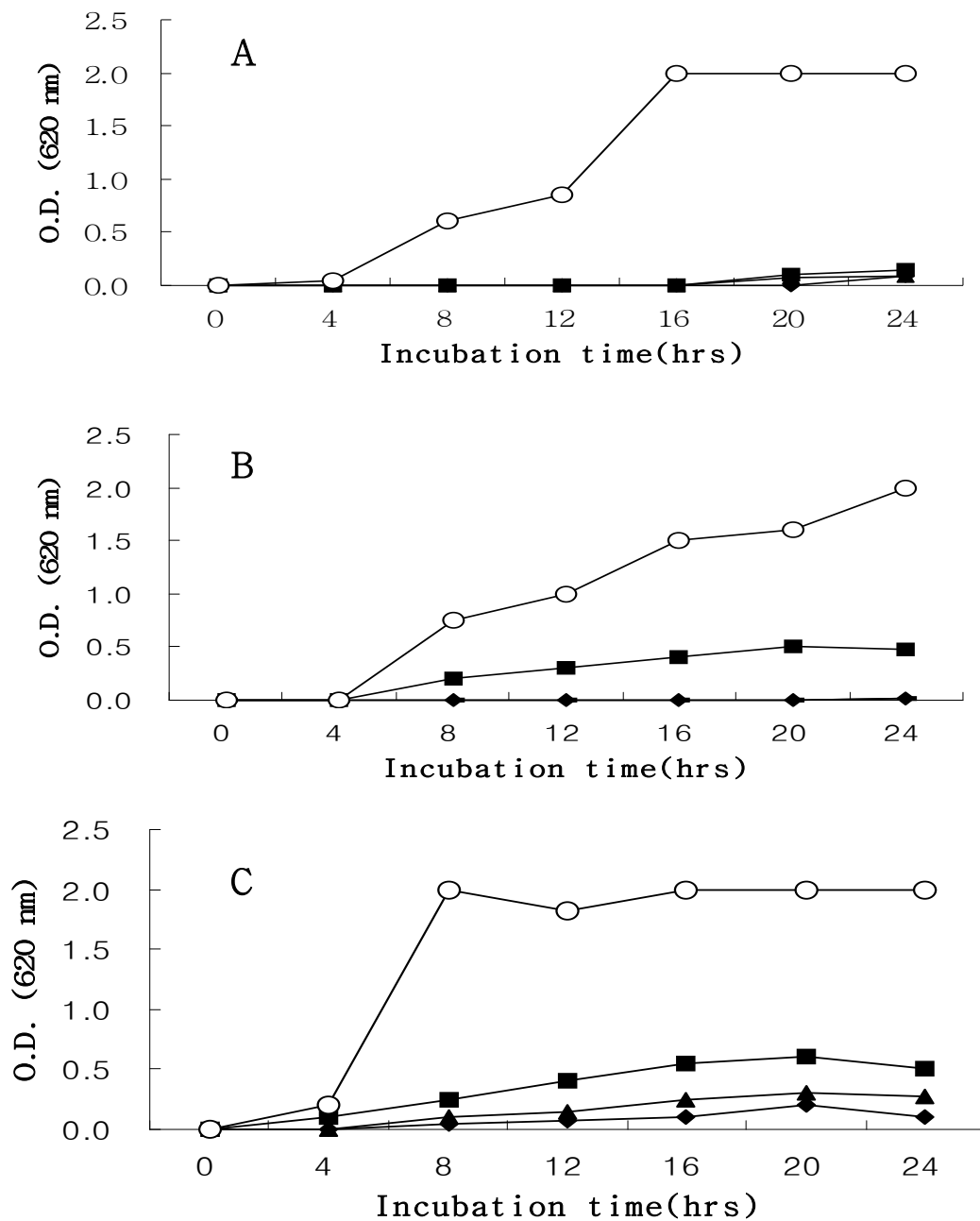


Fig.2-4 . Microbial growth curve in the medium containing green tea extract.
 A : *Escherichia coli* B : *Staphylococcus aureus* C : *Fusarium oxysporum*
 ○: Control; ●: 100 µg/ml ; ■: 500 µg/ml;
 ▲: 1000 µg/ml; ◆: 2500µg/ml; □: 5000µg/ml.

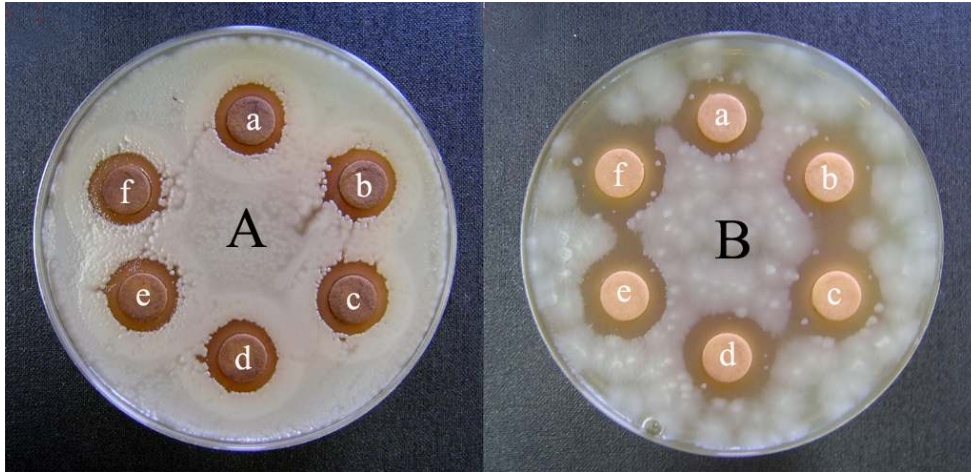


Fig. 2-5. Thermal stability of green tea extract on the growth inhibition of microorganism.

A : *Escherichia coli* B : *Staphylococcus aureus*
 a: 40°C-treated b: 60°C-treated c: 80°C-treated
 d: 100°C-treated e: 120°C-treated f: 150°C-treated

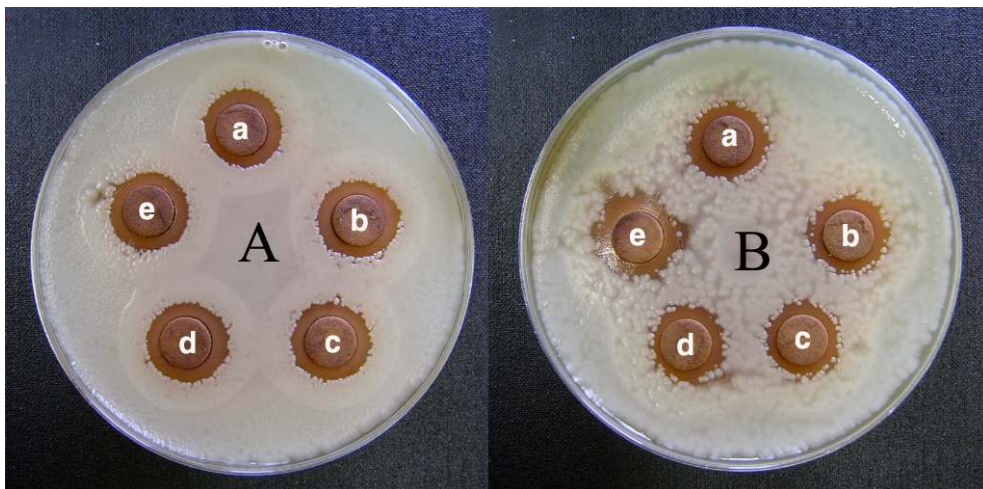


Fig. 2-6. pH stability of green tea extract on the growth inhibition of microorganism.

A : *Escherichia coli* B : *Staphylococcus aureus*
 a: pH 3.0, b: pH 5.0, c: pH 7.0, d: pH 9.0, e: pH 11.0

바. GTE가 미생물의 생리적 특성에 미치는 영향

(1) GTE가 미생물 에너지 생성대사관련 효소 활성화에 미치는 영향

GTE의 첨가배지상에서 미생물세포의 생육이 크게 억제된다는 실험결과를 토대로, 미생물에 대한 항균작용의 방식을 알아 보고자, *Enterobacter pyrinus*를 배양하여 분리한 여러가지 효소 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. 특히 에너지 대사와 관련된 효소들에 대한 영향을 살펴보기 위하여 여러가지 대사경로에서 주요한 역할을 하는 효소인, hexokinase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenase와 succinate dehydrogenase에 대한 영향을 살펴 보았다. 이중 hexokinase의 활성화는 glucose-6-phosphate dehydrogenase를 이용하여 coupling assay method를 사용하므로, 먼저 glucose-6-phosphate dehydrogenase에 대한 GTE의 효과를 살펴보았다. GTE를 각각 효소반응시 농도를 달리하여 첨가한 후 효소활성을 측정하였다. 대조구로는 이들 물질을 첨가하지 않고, 정상적인 효소활성을 나타내는 것을 사용하였으며 효소에 미치는 영향은 대조구에 대한 각 효소반응의 비율로 결정하였다. Table 2-13에서 보는 바와 같이, 미생물 에너지대사 관련 효소 중, glucose-6-phosphate dehydrogenase의 활성화는 GTE의 최종농도가 0.01%와 0.05%에서 각각 약간의 효소활성 억제되었으나, 유의성은 없었다. succinate dehydrogenase 및 malate dehydrogenase 효소활성은 GTE의 최종농도가 0.01%와 0.05%에서 각각 대조구에 비하여 94%와 86%, 93%와 87%로 나타나 약간의 효소활성 억제작용을 관찰할 수 있었다. hexokinase 효소활성의 경우, 추출물의 최종농도가 0.01%와 0.05%에서 각각 효소활성이 유의성 있는 억제효과를 보이지 않았으며, 전반적으로 에너지 생성대사에 미치는 GTE의 뚜렷한 효소활성 억제효과는 예상할 수 없었다. 이 결과로 GTE가 일부 에너지 생성대사의 효소활성에 영향을 미치는 것으로 나타났으나, GTE가 세포내로 침투하는가의 여부와는 상관없이 일부 효소의 활성을 부분적으로 억제하는 것으로 미루어 보아 세포내 대사를 억제하는 것을 확인하기 위해서는 추가적인 실험결과가 수반되어야 할 것으로 생각되었다.

Table 2-13. The relative activities of GTE on various metabolic enzymes concerned with energy production

Treatment	Conc. (%)	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	Succinate dehydrogenase	Malate dehydrogenase	Hexokinase
CONTROL		100	100	100	100
GTE	0.01	98	94	93	98
GTE	0.05	96	86	87	98

* Enzymatic activities were represented as percentage assuming the control as 100.

(2) 변패미생물의 세포막 기능에 미치는 GTE의 처리효과

GTE를 세포에 처리하였을 때, 세포막에 영향을 주는가를 알아보기 위하여 GTE의 존재하에서 *E. coli*의 세포내 β -galactosidase의 활성을 측정하였다. *E. coli*가 β -galactosidase를 생성하는가를 알아보기 위하여 IPTG와 X-gal을 가하여 준 배지에서 배양하여 파란색 colony가 발현으로 이 효소의 활성을 확인할 수 있었다. 이어서, 세포를 배양한 후, ONPG와 세포 혼합액에 증류수, toluene, acetone, GTE(0.01% 및 0.05%)를 가하여 주었다. 측정하고자 하는 효소 β -galactosidase가 배양세포내에 존재하므로 GTE가 세포막에 영향을 주어 세포막이 손상을 받아 β -galactosidase가 세포 밖으로 유출이 되어, toluene을 가하여 준 대조군에서 처럼 효소 활성이 검출되었다. Fig. 2-7에 나타낸 바와 같이, 증류수를 가해준 대조군에서의 값을 0으로하고 toluene을 가하여 준 대조군을 100으로 하였을 때, GTE 0.01%의 경우 55%, GTE 0.05%의 경우 90%의 활성이 검출되었다. acetone을 가하여 세포막을 손상하여 얻은 값이 10%였는데 이를 토대로 보면, GTE는 acetone보다 세포막을 더 손상 시키는 것으로 판단되었다. 이 결과의 양상과 세포 성장 억제 효과의 결과는 잘 일치하였으며, GTE의 항균작용은 에너지 생성대사의 억제를 유발하는 효과라기보다는 미생물의 세포막 기능에 손상을 주는 인자에 기인하는 것으로 생각되었다.

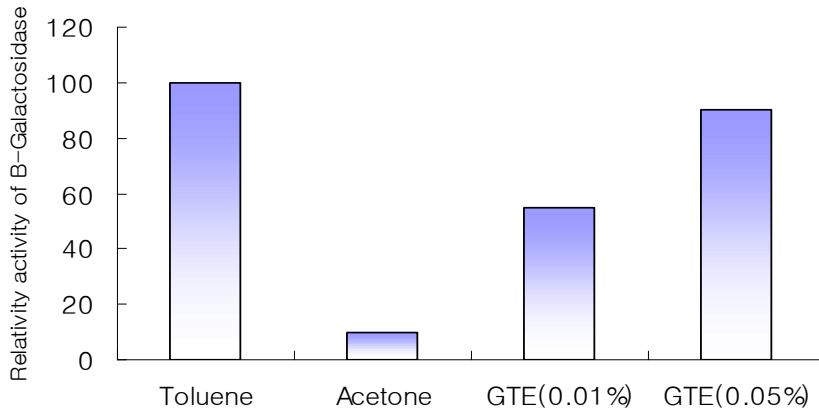


Fig. 2-7. The effect of GTE on the membrane perturbation of *Escherchia coli*.

The cells were treated with the reagents including toluene, acetone, GTE(0.01% or 0.05%) in the media containing ONPG as substrate for β -galactosidase.

(3) 전자현미경을 이용한 미생물의 세포형태변화

GTE의 미생물세포 생리특성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 경상대학교 식품공학과에 보관중인 *Escherchia coli*, *Staphylococcus aureus* 및 *Fusarium oxysporum* 균체세포를 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 GTE용액으로 처리한 균체세포 및 포자를 처리하지 않은 대조구와 함께 전자현미경 검경시료로 조제하여 SEM으로 촬영한 결과는 Fig. 2-8, Fig. 2-9 및 Fig. 2-10과 같다. 즉, Fig. 2-8, Fig. 2-9 및 Fig. 2-10에서 보는 바와 같이 SEM에 의한 시료촬영결과에서 GTE처리로 미생물 균체가 세포벽 또는 세포막의 기능과 파괴로 인하여 세포형태의 변화가 뚜렷하게 발생하고, 사멸하게 되어 미생물 균체세포에 대한 GTE의 항균작용을 확인할 수 있었고, 부패성 및 병원성 균주오염 가능성이 있는 식품을 GTE로 예방처리함으로써, 변패성 미생물균주에 의한 농축수산 식품원료 및 그 가공식품의 변패현상을 억제할 수 있을 것으로 생각된다.

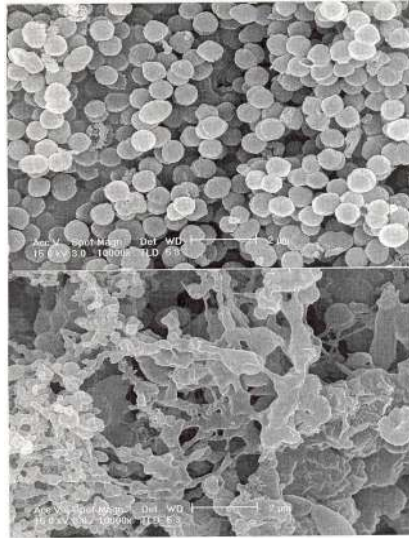


Fig. 2-8. Scanning electron micrographs of *Escherichia coli* not-treated (Top : Control) and treated with GTE (Bottom : 250 µg/ml). (Magnification : x 10,000)

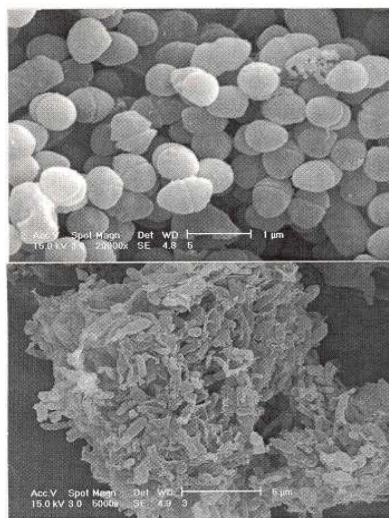


Fig. 2-9. Scanning electron micrographs of *Staphylococcus aureus* not-treated (Top: Control) and treated with GTE (Bottom : 250 µg/ml). (Magnification : x 10,000)

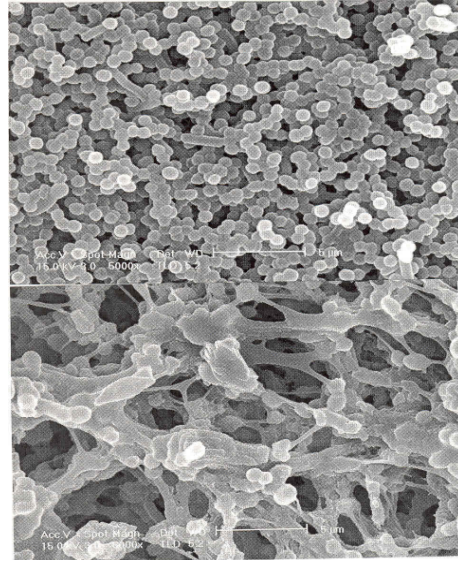


Fig. 2-10. Scanning electron micrographs of *Fusarium oxysporum* not-treated (Top : Control) and treated with GTE(Bottom : 250 µg/ml). (Magnification : x 10,000)

사. NMR에 의한 항균물질의 구조분석

(1) 항균물질의 분리 및 측정

Table 2-14에서 보는 바와 같이, Column chromatography에서 분리하여 항균력이 확인된 각 항균분획물질(Compound A, Compound B, Compound C, Compound D)의 구조분석을 위해 ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼을 실온에서 측정하였다. 즉, Column chromatography에서 분리된 fraction중, 4개의 fraction에서 미생물의 생육저해환을 나타내었고, Compound D fraction에서 공시균주인 변패미생물 전반에 걸쳐 뚜렷한 생육저해환을 보여, 강력한 항균 작용을 소유한 물질을 함유한 분획임을 확인할 수 있었다. 따라서, column chromatography에서 분리하여 항균력이 확인된 각 항균분획물질의 구조분석을 위해 ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼을 실온에서 측정하였다

Table 2-14. Inhibitory zone (mm) caused by the antimicrobial fraction of individual solvent extract from GTE against food spoilage microorganisms

Microorganism	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Fusarium</i> sp.
Control	10	10	10	10
Compound A	13	12	12	11
Compound B	15	14	17	15
Compound C	17	16	17	17
Compound D	18	19	18	18

(2) NMR에 의한 추출물질의 구조분석

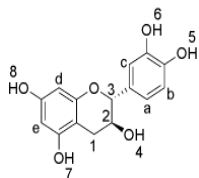
(가) 기기 및 측정

본 실험에서 사용한 NMR은 Bruker DRX500 (500 MHz)로 측정했으며 사용한 용매는 CD₃CN이며 TMS를 기준물질로 사용하였다.

(나) Compound A

① Compound A의 ¹H-NMR 스펙트럼 해석

Fig. 2-11과 옆의 그림에서 보는 바와 같이 compound A의 ¹H-NMR 스펙트럼으로부터 모든 특성 공명선의 해석이 다음과 같이 가능하여 본 물질이 (+)-catechin임을 확인할 수 있었다. 먼저 (+)-catechin의 두 방향족 고리의 5개의 수소 (a, b, c, d, e)가 5.88에서 6.87 ppm에서 나타남을 확인하였다. a와 b의 수소는 6.78과 6.77 ppm에서 각각 이중선으로 나타났다.



(+)-Catechin

c의 수소는 6.87에서 이중선으로, d와 e는 5.96과 5.89 ppm에서 각각 이중선으로 나타났다. 방향족에 붙어있는 OH의 수소 5, 6은 6.7~6.8 사이에서 a, b 수소에 묻혀서 나왔으며, 7, 8은 6.83, 6.85 ppm에서 단일선으로 나타났다. 지방족 고리에 붙어있는 OH의 수소 4는 3.02 ppm에서 단일선으로 나타났다.

족 고리에 있는 수소 1은 2.43에서 2.84 사이에서 이중-이중선으로 나타났으며, 2는 4.01에서 사중선으로, 3은 4.61 ppm에서 이중선으로 나타났다.

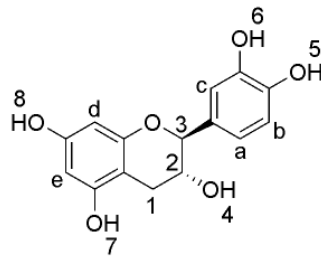
② Compound A의 ^{13}C -NMR 스펙트럼 해석

Fig. 2-12 에서 보는 바와 같이 compound A의 모든 탄소 공명선은 잘 해석이 가능해 ^1H -NMR의 해석 결과와 동일하게 (+)-catechin으로 규명되었다. 산소를 포함하는 지방족 고리의 3개의 1, 2, 3 탄소가 27.02, 66.76, 81.06 ppm에서 각각 나타났다. 또한 OH기가 붙어 있는 방향족 탄소인 7, 8, 12, 14의 피크가 155.53, 155.61, 144.06, 144.08 ppm에서 각각 나타났으며, 나머지 방향족 탄소들은 94.33, 94.80, 99.65, 113.90, 114.68, 119.18, 130.96, 156.09 ppm에서 나타났다.

(다) Compound B

① Compound B의 ^1H -NMR 스펙트럼 해석

Fig. 2-13과 옆의 그림에서 보는 바와 같이 compound B의 ^1H -NMR 스펙트럼 으로부터 모든 특성 공명선의 해석이 다음과 같이 가능하여 본 물질이 (-)-catechin임을 확인할 수 있었다. 먼저 (-)-catechin의 두 방향족 고리의 5개의 수소 (a, b, c, d, e)가 5.85에서 6.83 ppm에서 나타남을 확인하였다. a와 b의 수소는 6.75와 6.73 ppm에서 각각 이중선으로 나타났다.



(-)-Catechin

c의 수소는 6.83에서 이중선으로, d와 e는 5.93과 5.85 ppm에서 각각 이중선으로 나타났다. 또한 방향족에 붙어있는 OH의 수소 5, 6은 6.6~6.7 사이에서 나타났으며, 7, 8은 6.74, 6.80 ppm에서 단일선으로 나타났다. 지방족 고리에 붙어있는 OH의 수소 4는 3.02 ppm에서 단일선으로 나타났다. 지방족 고리에 있는 수소 1은 2.40에서 2.80 사이에서 이중-이중선으로 나타났으며, 2는 3.97에서 사중선으로, 3은 4.57 ppm에서 이중선으로 나타났다.

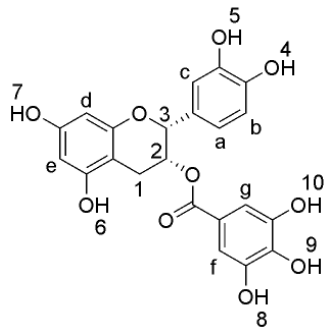
② Compound B의 ^{13}C -NMR 스펙트럼 해석

Fig. 2-14에서 보는 바와 같이 compound B의 모든 탄소 공명선은 잘 해석이 가능해 ^1H -NMR의 해석 결과와 동일하게 (-)-catechin으로 규명되었다. 산소를 포함하는 지방족 고리의 3개의 1, 2, 3 탄소가 27.03, 66.74, 81.07 ppm에서 각각 나타났다. 또한 OH기가 붙어 있는 방향족 탄소인 7, 8, 12, 14의 피크가 155.53, 155.61, 144.06, 144.08 ppm에서 각각 나타났으며, 나머지 방향족 탄소들은 94.32, 94.78, 99.66, 113.89, 114.67, 119.18, 130.98, 156.09 ppm에서 나타났다.

(라) Compound C

① Compound C의 ^1H -NMR 스펙트럼 해석

Fig. 2-15와 옆의 그림에서 보는 바와 같이 compound C의 ^1H -NMR 스펙트럼으로부터 모든 특성 공명선의 해석이 다음과 같이 가능하여 본 물질이 (-)-epicatechin gallate임을 확인할 수 있었다. (-)-Epicatechin gallate의 세 방향족 고리의 7개의 수소 (a, b, c, d, e, f, g)가 5.96에서 6.93 ppm에서 나타남을 확인하였다. a와 b의 수소는 6.84와 6.83 ppm에서 각각 이중선으로 나타났다.



(-)-Epicatechingallate

c의 수소는 6.93 ppm에서 이중선으로 나타났으며, d와 e는 5.99와 5.97 ppm에서 각각 이중선으로 나타났다. 또한 f와 g의 수소는 같은 조건상에 놓여 있어서 6.90 ppm에서 단일선으로 나타났다. 방향족에 붙어있는 OH의 수소 4-10은 6.76과 6.74의 두 개의 단일선과 그 사이에서 넓은 영역을 가지고 나타났다. 지방족 고리에 있는 수소 1은 2.79에서 2.99사이에서 이중-이중선으로 나왔으며, 2의 수소는 5.50 ppm에서 다중선으로 나타났으며, 3의 수소는

5.07 ppm에서 단일선으로 나타났다.

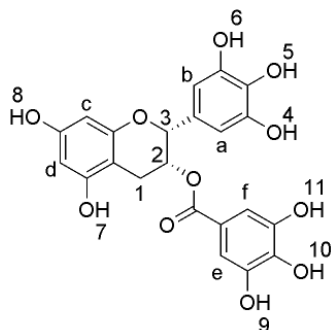
② Compound C의 ^{13}C -NMR 스펙트럼 해석

Fig. 2-16에서 보는 바와 같이 compound C의 모든 탄소 공명선은 잘 해석이 가능해 ^1H -NMR의 해석 결과와 동일하게 (-)-epicatechin gallate으로 규명되었다. 산소를 포함하는 지방족 고리의 3개의 1, 2, 3 탄소가 25.06, 67.93, 76.67 ppm에서 각각 나타났다. 카르보닐 탄소 16의 경우, 인접한 산소의 벵김효과에 의해서 가장 저장인 164.59 ppm에서 나타나는 특징을 보이고 있다. OH기가 붙어 있는 방향족 탄소인 7, 8, 12, 14, 19, 20의 피크가 155.88, 155.81, 143.88, 143.83, 137.06, 144.27 ppm에서 각각 나타났으며, 나머지 방향족 탄소들은 94.63, 95.15, 98.01, 108.65, 113.38, 114.51, 118.26, 120.79, 130.35, 156.20 ppm에서 나타났다.

(마) Compound D

① Compound D의 ^1H -NMR 스펙트럼 해석

Fig. 2-17과 옆의 그림에서 보는 바와같이 compound D의 ^1H -NMR 스펙트럼으로부터 모든 특성공명선의 해석이 다음과 같이 가능하여 본 물질이 (-)-epigallocatechin gallate임을 확인할 수 있었다. (-)-Epigallocatechin gallate 의 세 방향족 고리의 6개의 수소 (a, b, c, d, e, f)가 5.96에서 6.91 ppm에서 나타남을 확인하였다. a와 b의 수소는 같은 조건의 위치에 존재하기 때문에



(-)-Epigallocatechingallate

6.69 ppm에서 단일선으로 나타났다. 마찬가지로 e와 f의 수소도 같은 조건에 놓여 있고, 카르보닐기의 벵김효과 때문에 가장 저자장인 6.91 ppm에서 단일선으로 나타났다. c와 d는 6.00과 5.97 ppm에서 각각 이중선으로 나타났

다. 방향족에 붙어있는 OH의 수소 4-11은 6.74에서 6.65 ppm 사이에서 넓은 영역을 가지고 나타났다. 지방족 고리에 있는 수소 1은 2.77에서 2.98사이에서 이중-이중선으로 나왔으며, 2의 수소는 5.49 ppm에서 다중선으로 나타났으며, 3의 수소는 4.99 ppm에서 단일선으로 나타났다.

② Compound D의 ^{13}C -NMR 스펙트럼 해석

Fig. 2-18에서 보는 바와 같이 compound D의 모든 탄소 공명선은 잘 해석이 가능해 ^1H -NMR의 해석 결과와 동일하게 (-)-epigallocatechin gallate으로 규명되었다. 산소를 포함하는 지방족 고리의 3개의 1, 2, 3 탄소가 25.06, 67.80, 76.63 ppm에서 각각 나타났다. 카르보닐 탄소 14의 경우, 인접한 산소의 벗김효과에 의해서 가장 저장인 162.37 ppm에서 나타나는 특징을 보이고 있다. OH기가 붙어 있는 방향족 탄소인 6, 7, 10, 12, 17, 18의 피크가 155.76, 144.24, 129.81, 128.21, 155.85, 144.60 ppm에서 각각 나타났으며, 나머지 방향족 탄소들은 94.59, 95.10, 98.01, 105.49, 108.65, 120.80, 131.41, 137.02 ppm에서 나타났다.

(3) 고분해능 질량분석

기존의 저분해능 질량분석이 분자량 측정에 머무는 반면, 고분해능 질량분석은 최근 기술발달에 의해, 질량분석으로 화합물의 분자식 조성이 가능해짐에 따라 분자식을 확인할 수 있는 강력한 방법으로 평가 받고 있다. 따라서 본 연구에서는 다양한 이온화 방법을 이용하여 각 시료에 대하여 질량분석을 시도한 결과, EI (electron impact, 고속 원자 충격) 방식을 이용하여 어미 이온의 피크를 얻을 수 있어(Fig. 2-19 ~ Fig. 2-22) 분자량 측정이 가능하였다. 결과는 동위원소 패턴을 이용하여 비교함으로써 조성식을 확인하였다.

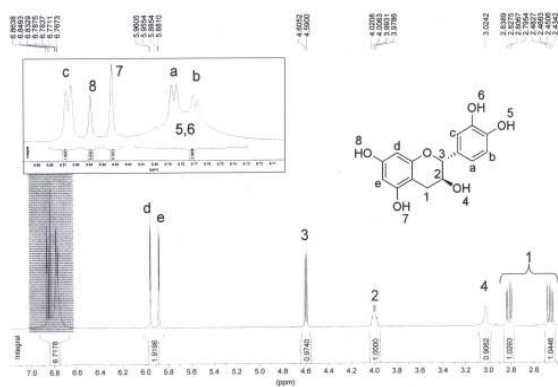


Fig. 2-11. 500 MHz $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Compound (A) in CDCl_3 .

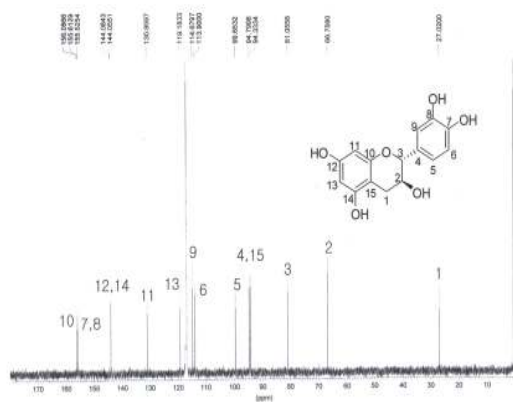


Fig. 2-12. 125 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of Compound (A) in CDCl_3 .

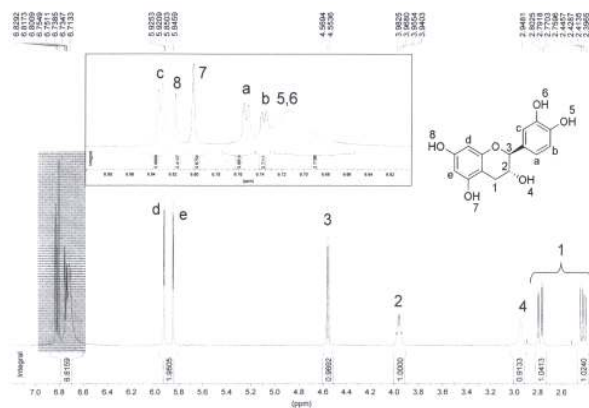


Fig. 2-13. 500 MHz ^1H -NMR spectrum of Compound (B) in CDCl_3 .

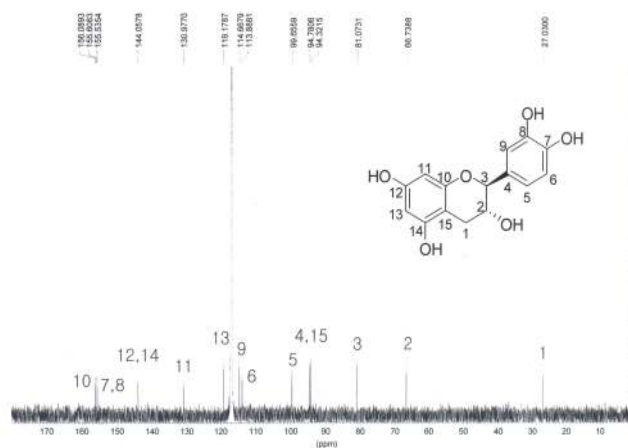


Fig. 2-14. 125 MHz ^{13}C -NMR spectrum of Compound (B) in CDCl_3 .

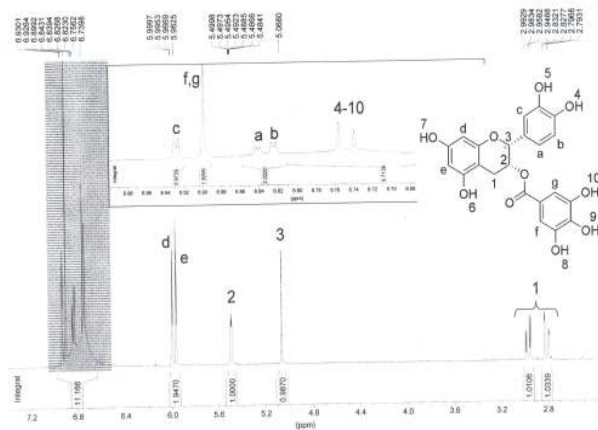


Fig. 2-15. 500 MHz ¹H-NMR spectrum of Compound (C) in CDCl₃.

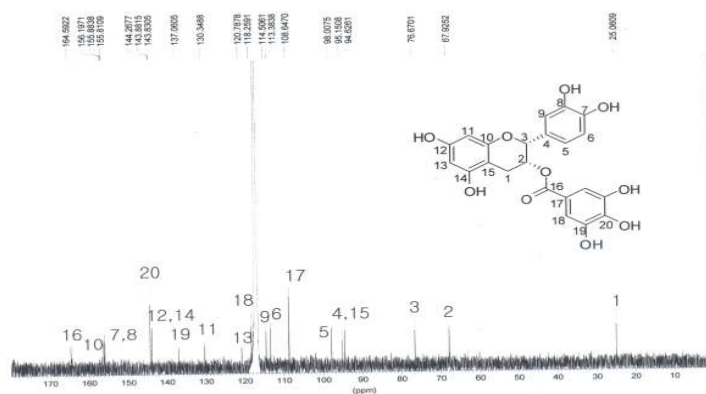


Fig. 2-16. 125 MHz ¹³C-NMR spectrum of Compound (C) in CDCl₃.

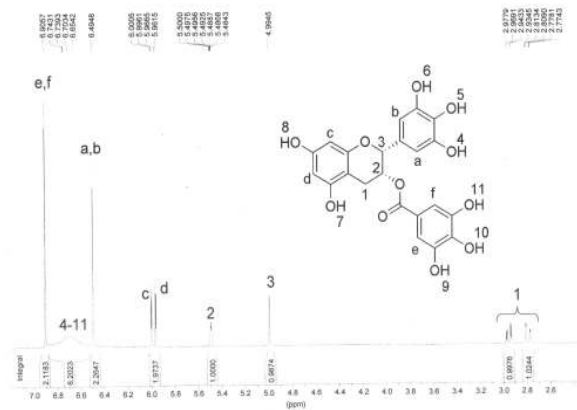


Fig. 2-17. 500 MHz ^1H -NMR spectrum of Compound (D) in CDCl_3 .

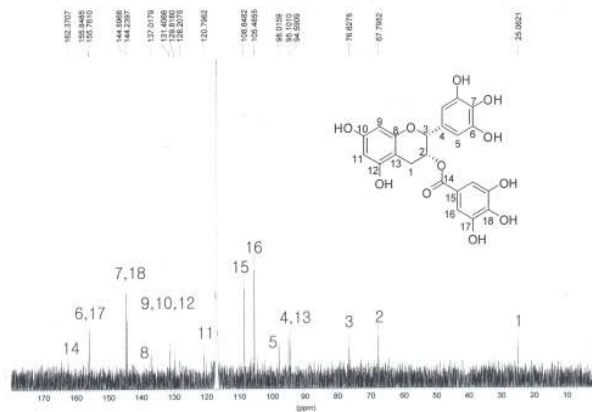


Fig. 2-18. 125 MHz ^{13}C -NMR spectrum of Compound (D) in CDCl_3 .

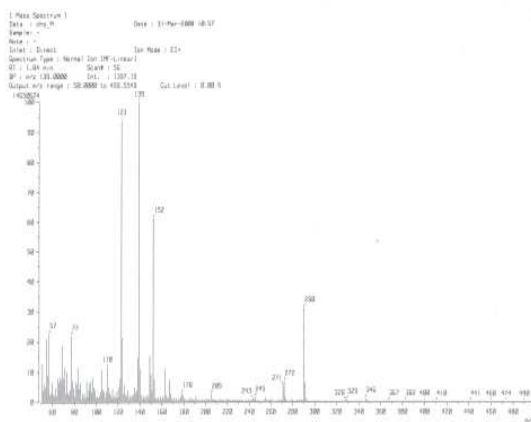


Fig. 2-19. Mass spectrum of Compound (A).

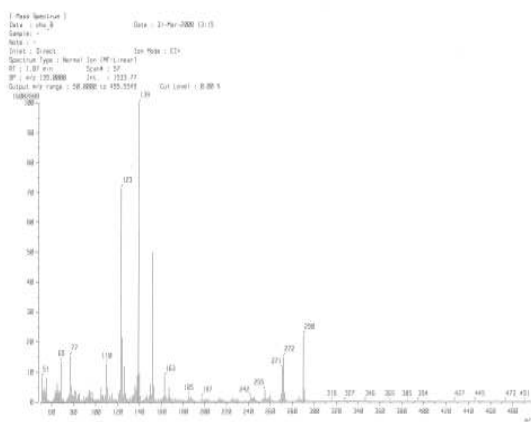


Fig. 2-20. Mass spectrum of Compound (B).

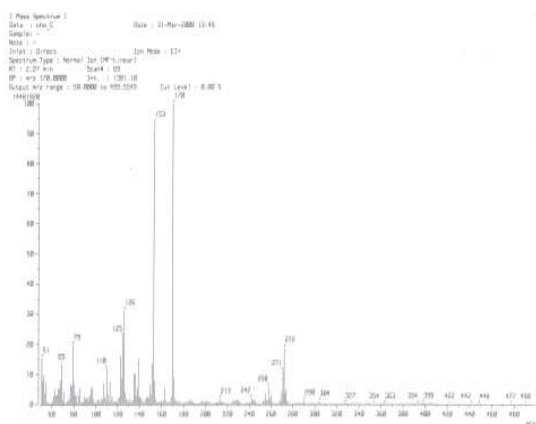


Fig. 2-21. Mass spectrum of Compound (C).

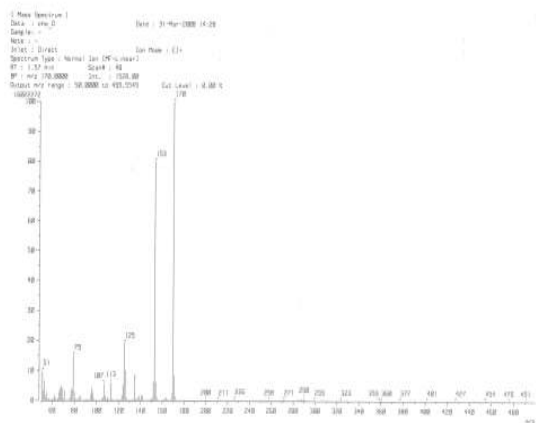


Fig. 2-22. Mass spectrum of Compound (D).

아. 녹차추출물의 안전성 검사

본 연구에서 추출, 분리된 녹차추출물은 광범위한 범위의 병원성 및 부패성 미생물에 대한 뚜렷한 항균성을 보이는 것으로 확인되었으며, 녹차추출물을 천연항균 기능성을 활용하기 위한 필수요건으로 안전성이 확보되어야 한다. 따라서, 이를 충족시키기 위한 안전성 실험으로 급성경구독성, 피부독성 및 안점막 독성실험을 실시하여 다음과 같은 결과를 획득하였다.

(1) 급성 경구 독성 시험

먼저, 녹차추출물을 실험동물인 흰쥐에 구강 투여하여 2주간 사육하는 동안 치사율을 측정된 결과는 Table 2-15와 같다.

Table 2-15. The mortality rates of rats during the 14-days observation period with administration of green tea extract

Dose (g/kg)	Time of death									
	Hour		Days							
	6	12	1	2	3	4	5	6	14	
Control	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
1.5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
3.0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	1/10	
6.0	0/10	0/10	0/10	0/10	3/10	3/10	4/10	5/10	5/10	
8.5	0/10	2/10	5/10	7/10	9/10	9/10	10/10	10/10	10/10	
12.0	1/10	2/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	

* Values are number of animals dead/number of animals tested, cumulative.

즉, 흰쥐의 치사율을 근거로 계산한 50% 치사량(LD₅₀)은 5.95 g/kg 이었다. 죽은 흰쥐를 부검한 결과 모두에서 장내 소화기관 세포의 파손이 거의 목격되지 않았다. 살아남은 흰쥐들의 행동은 정상이었으며, 14일 후 희생시켜 부검한 결과에서도 육안적 병변은 관찰되지 않았다.

(2) 피부 자극 시험

흰토끼의 피부에 녹차추출물을 도포하고 1, 3, 7, 14일 후에 관찰한 결과는 Table 2-16과 같다. 즉, 피부에 생긴 병변의 심한 정도는 정상 피부와 찰과상을 입힌 피부에서 같았으며, 녹차추출물 도포한 후 1일째의 홍반 점수는

평균 2.50이었고, 3일째는 1.67, 7일째는 1.00, 14일 이후에는 0.83 이었다. 부종 점수는 1일부터 7일까지 평균 0.17 이었으며, 14일에는 0 이었다. 사육 기간 중, 다소 표피가 이탈되는 듯한 현상이 발생하였으나, 그와 같은 병발 현상은 아주 경미한 정도였다.

Table 2-16. Primary irritation scores in rabbits following a patch application of green tea extract

Symptoms	Time (day)	Rabbit number						Average
		1	2	3	4	5	6	
Erythema								
Intact skin	1	3	3	3	2	2	2	2.50
	3	2	2	2	2	1	1	1.67
	7	1	1	1	1	1	1	1.00
	14	1	1	1	1	0	1	0.83
Abraded skin	1	3	3	3	2	2	2	2.50
	3	2	2	2	2	1	1	1.67
	7	1	1	1	1	1	1	1.00
	14	1	1	1	1	0	1	0.83
Edema								
Intact skin	1	1	0	0	0	0	0	0.17
	3	1	0	0	0	0	0	0.17
	7	0	1	0	0	0	0	0.17
	14	0	0	0	0	0	0	0.00
Abraded skin	1	1	0	0	0	0	0	0.17
	3	1	0	0	0	0	0	0.17
	7	0	1	0	0	0	0	0.17
	14	0	0	0	0	0	0	0.00

(3) 안점막 자극 시험

흰토끼의 안점막에 녹차추출물을 점안한 후 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14일에 관찰한 결과는 Table 2-17과 같다. 즉, 녹차추출물을 점안한 후 1, 2, 3일째의 눈의 병변의 점수는 70.0, 70.0, 68.0이었으며 4일째에는 67.0, 7일째는 57.5, 10일째는 48.0, 14일째는 38.5 이었다. 녹차추출물을 점안한 후, 물로 세척한 군의 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14일째의 눈의 병변의 점수는 각각 평균 61.5, 46.5, 44.5, 35.0, 20.0, 8.5, 7.5 이었다. 이 결과로 미루어 볼 때, 녹차추출물은 안점막에 대한 자극이 약간 있는 것으로 나타났으나, 녹차추출물 점안 즉시, 물로 세척할 경우, 자극독성이 크게 낮아지므로 특이한 병변을 막기 위해서는

눈에 녹차추출물이 들어갔을 때, 즉시 물로 세척해 주면 안전하다고 볼 수 있다.

Table 2-17. Eye irritation scores in rabbits following application of green tea extract

	Time (day)	Cornea		Iris	Conjunctiva			Total score
		Opacity	Area		Hyperemia	Swelling	Discharge	
Not washed group (n=6)	1	3.0	3.0	2.0	2.5	3.0	2.0	70.0
	2	3.0	3.0	2.0	2.5	3.0	2.0	70.0
	3	3.0	3.0	2.0	2.5	2.5	1.5	68.0
	4	3.0	3.0	2.0	2.0	2.5	1.5	67.0
	7	2.5	3.0	2.0	2.0	2.0	1.0	57.5
	10	2.0	3.0	2.0	1.5	1.5	1.0	48.0
	14	1.5	3.0	2.0	1.0	1.0	1.0	38.5
Washed group (n=3)	1	3.0	3.0	0.5	2.0	3.0	2.0	61.5
	2	2.0	3.0	0.5	2.0	3.0	2.0	46.5
	3	2.0	3.0	0.5	1.5	3.0	1.5	44.5
	4	1.5	3.0	0.5	1.5	2.0	1.5	35.0
	7	1.0	3.0	0.0	1.0	1.0	0.5	20.0
	10	0.5	3.0	0.0	0.5	0.0	0.0	8.5
	14	0.5	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.5

녹차추출물을 흰쥐에 투여했을 때의 50% 치사량 (LD₅₀)은 5.95 g/kg 으로 이는 국립보건안전연구원 예규 제 10호에 의한 저독성의 기준 5 g/kg을 상회하는 비교적 저독성이라고 볼 수 있다. 녹차추출물을 흰토끼의 피부에 도포하였을 때의 병변의 정도는 홍반과 부종의 경우, 총 가능 점수 4.0에 대해 제 1일에 각각 2.50과 0.17로서 비교적 약하다고 생각된다. 또한 이러한 병변은 2주일 후에는 각각 0.83과 0으로 거의 사라졌다고 볼 수 있다. 아울러, 흰토끼의 안점막에 녹차추출물을 점안했을 때의 병변은 제 1일에 70.0 으로 심한 편이었으나, 14일에는 38.5 로서 자극성이 크게 감소하였다. 녹차추출물을 점안한 후, 빠른 시간내에 물로 세척한 경우에는 14일까지 7.5 정도로 병변이 관찰되었으나 세척하지 않은 경우에 비해 병변의 정도가 크게 약화되었다. 따라서 눈에 대해서는 약간의 자극성이 있으므로 녹차추출물이 눈에 들어갔을 때에는 즉시 물로 씻어 주는 편이 좋을 것이다. 이상의 안전성 실험결과를 종합하여 볼 때, 녹차추출물은 비교적 안전한 천연추출물로 판단할 수 있는 것으로 나타났다.

자. 농축수산 식품소재 및 가공식품에 대한 GTE의 처리효과

천연보존료라는 것은 방부작용을 갖는 천연물질(에탄올, lysozyme, 자몽종자추출물, 향신료 등)이다. 식품위생법에 의해서 지정된 식품첨가물 중 표시의무, 사용제한이 없는 것(글라이신, 각종 유기산 및 그 염, 저급 지방산, 에스테르, 중합인산염 등)을 소재로 하여 그들을 효과적으로 배합하고 상품화한 보존료이고 표시의무나 사용제한이 없고 안전성이 높은 것을 특징으로 한 것이다. 최근에는 시판 식품의 종류가 매우 증가하였기 때문에 합성 보존료의 사용대상이 되지 않은 식품이나 보존성이 매우 낮은 식품 등이 증가하여 이들의 위생관리에 관심을 기울이고 있다. 한편, 소비자는 합성보존료의 안전성에 불안감을 느끼고 있어서 제조사측은 가능하다면 천연계보존료로 전환하여 상품의 이미지를 높이려고 하고 있다. 이와같은 것을 배경으로해서 천연계 보존료가 주목 받고 있다. 각 방면에서 이용되도록 되었다. 그래서 싼 가격으로 훌륭한 효과가 있고 용도과 넓은 것을 목표로하여 더욱 개발을 진행하고 있다. 천연보존료의 소재로서 최근 주목되고 있는 것의 하나로서 녹차추출물을 들 수 있다. 녹차추출물의 방부효과는 옛날부터 알려져 있어서 고기를 염장하고 훈제할 때 착향, 탈취 뿐 아니라 보존의 목적도 겸해서 사용해왔다. 녹차추출물은 항균력을 갖는 것이 있지만, 태반의 경우, 항균성분은 곧 항기능성 성분이기 때문에 식품에 대하여 유효농도까지는 첨가할 수 없다. 그래서 생각한 것이 작용이 다른 약초성분 및 향신료 또는 항균성분을 병용하여 보존작용 및 냄새마스킹 효과를 유도할 수 있을 것으로 생각하게 되었다. 그러나, 녹차의 항균작용에 대한 연구는 미흡하며, 이와 같은 녹차의 기능성을 넓게 활용하고자 하는 연구는 거의 없는 형편이다. 따라서, 본 연구에서는 식품보존료로서의 녹차추출물에 대한 기능성을 확인하고자, 천연식품소재 및 가공품에 대한 녹차추출물의 보존효과를 검토하였다.

(1) 나물류 및 발효침채류

최근, 건강을 염려하는 소비자의 기호에 따라 점차 침채류의 염분농도를 낮추려고 하는 경향이 뚜렷해 지고 있다. 침채류의 절임농도는 채소류의 종류에 따라 다소 차이가 있으나 전반적으로 크게 낮아지는 경향이다. 일반적으로 식염은 절입물 제조에 불가결한 것이고, 염분의 저하는 직접 보존성의 저하와 결부되는 것이기 때문에 업계의 저염화의 노력이 필수적인 입장이다. 현재 저온관리, 가열살균 등의 물리적 수단과 동시에, 화학합성 보존료 이용을 통하여 침채류의 보존기간을 연장하고자 하는 것이 일반화된 편법이다. 이러한 상황에서 천연보존료의 활용은 소비자의 건강을 전제로 그 활용이 요구되고 있다.

(가) 절임배추

절임배추류에는 합성보존료가 사용되지 않았기 때문에 미생물에 오염되기 쉽고 가열살균도 할 수 없기 때문에 대장균군에 대한 오염도를 고려해야 된

다. 대장균균에 대한 녹차추출물에 대한 효과를 Table 1에 나타내었다. 먼저, typtic soy broth 배지중에 대장균균을 2.8×10^4 개 접종하여 30°C에서 배양하고 이 중, 대장균균을 10^5 개/ml을 채취하여 배추절임액에 접종하고 15-18°C에서 보관한 후, 침지액에 백탁도가 심화되어 상품가치가 없어지는 관찰결과는 Table 2-18과 같다. 즉, 녹차추출물 첨가구에서는 식염농도 2% 군보다도 5% 군쪽이 효과가 있고 녹차추출물 0.01%구에서 대조구에 비하여 3일, 0.05% 구에서는 5일의 보존연장효과가 있었다. 실제 유통조건에서는 10°C 전후의 냉장 케이스에 들어있기 때문에 본 결과보다 수일 보존 연장이 기대된다.

Table 2-18. White-colored precipitation of Korean cabbages steeped in the salt solution during storage period in the preservation temperature of 15-18°C.

NaCl Level (%)	Test Sample (%)	Storage Period(days)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
2	Control	+	+	+	+						
	GTE 0.01%	-	-	-	+	+	+				
	GTE 0.05%	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
5	Control	+	+	+	+						
	GTE 0.01%	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
	GTE 0.05%	-	-	-	-	-	-	-	+	+	

* + : white-colored precipitated solution, - : clear & transparent solution
 * The 10^4 /ml of coliform bacteria was initially inoculated in the salty solution.

(나) 단무지

조미 단무지는 모두 저염이고 합성보존료 무첨가의 소포장(병조림, 통조림) 밀봉으로 많이 출하되고 있고 대부분이 포장 후 가열처리를 하고 있다. 그러나 고온 또는 장시간 가열하면 식감이 손상되기 때문에 충분한 살균효과를 올릴 수 없고 부패음을 억제하기가 어렵다. Table 2-19는 조미절임시 조미액의 균수를 조사한 것이다. 무첨가구인 대조구는 3일째, 백탁현상을 보였으나 GTE 0.01% 첨가구에서는 7일째에도 균수는 증가하지 않았다. 아울러, GTE첨가구의 경우, 0.05%군은 40일이상 정상적인 상태로 보존되었다.

Table 2-19. Change of the cell count of microorganism contaminated on the flavored *Danmooji* during the storage period in the preservation temperature of 15-18°C.

Sample	Test organisms	Micro-	Storage Period(days)				
			0	1	3	5	7
Control	Bacteria Yeasts & Molds		3.2×10^2	2.6×10^4	3.9×10^4	1.1×10^6	7.3×10^7
			4.0×10	6.2×10	7.5×10	7.0×10	4.5×10
GTE 0.01%	Bacteria Yeasts & Molds		3.2×10^2	7.6×10	5.5×10^2	7.1×10^2	4.2×10^3
			4.0×10	1.2×10	<10	<10	<10
GTE 0.05%	Bacteria Yeasts & Molds		3.2×10^2	2.6×10^4	3.9×10^4	1.1×10^6	7.3×10^7
			4.0×10	<10	<10	<10	<10

* Salt concentration : 4.0 %

(다) 김치제조용 배추

합성보존료를 사용할 수 없고 가열살균도 할 수 없기 때문에 변패하기 쉬운 배추김치에 관해서 실험한 결과를 Table 2-20에 나타냈다. 무처리구인 대조구에서는 저장 3일째까지 균수가 크게 증가하여 배추가 팽창하는 현상을 보였으나, 0.01% GTE 첨가구의 경우, 오염미생물의 수가 크게 격감하여 저장 7일째까지도 팽창하는 현상이 없었으며, 0.05% GTE첨가에 의해서 2배 이상의 보존효과가 있음을 확인할 수 있었다.

Table 2-20. Change of the cell count of microorganism contaminated in the Korean cabbage steeped in the 10°C of salty solution

Sample	Test organisms	Micro-	Storage Period(days)				
			0	1	3	5	7
Control	Bacteria Yeasts & Molds		3.2×10^2	2.6×10^4	3.9×10^4	1.1×10^6	7.3×10^7
			4.0×10^2	6.2×10^2	7.5×10^2	2.4×10^3	4.5×10^3
GTE 0.01%	Bacteria Yeasts & Molds		3.1×10^2	3.8×10^2	6.9×10^2	2.1×10^3	4.3×10^3
			4.3×10^2	2.2×10^2	<10 ²	<10 ²	<10 ²
GTE 0.05%	Bacteria Yeasts & Molds		2.9×10^2	3.6×10^2	4.7×10^2	5.1×10^2	7.3×10^2
			2.8×10^2	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²

(라) 반찬류

식생활의 다양화로 반찬은 점점 종류가 증가하고 간편성, 경제성도 요구되고 수요도 현저히 증가하고 있다. 반찬의 구입에서 미가열이고 그대로 먹는 것들이 많기 때문에 위생적으로 안전성이 높은 것이 요구된다. 그러나 대부분의 반찬은 수분활성이 0.9이상이고 매우 보존성이 결핍되어 한 공장에서 다품종의 제품을 만드는 경우가 많기 때문에 위생관리가 어렵다. 반찬에는 합성보존료를 사용할 수 없기 때문에 앞에서 언급한 바와 같은 요구를 만족할 만한 보존료는 천연계여야 한다. 본 실험에서는 반찬류 중, 야채 샐러드를 선택하여 녹차추출물의 처리효과를 검토하고자 하였다.

샐러드는 원료 야채, 드레싱, 향신료 등의 활용으로 다양하고 풍부한 상품이 시판되고 있다. 조리빵에도 이용되고 있고 이와 같은 서양식 반찬은 특히 젊은 세대에서 인기가 있다. 샐러드가 보존성은 pH가 크게 좌우하지만 식초 등에 의한 pH 저하만으로는 불충분하고 또 통상 저온 유통되고 있지만 유산균, 일부의 Micrococcus, 대장균군, 곰팡이 및 효모 등은 15℃정도에서도 증식할 수 있으므로 관리가 어렵다. Table 2-21은 녹차추출물 처리에 의한 미생물의 오염억제효과를 검토한 시험결과이다. 즉, 무처리구인 대조구의 경우, 저장 4일째 일반세균 및 효모, 곰팡이 등 변패미생물이 급증하여 부패취가 심했다. 녹차추출물 처리구의 경우, 0.01%처리구는 저장 8일째 다소 변패도를 실감할 수 있었고, 0.05%처리구는 저장 8일째에도 신선도를 유지하는 것으로 나타나, 저장온도 15℃에서 저장한 샐러드는 대조구보다 2배이상의 선도유지 기간을 연장할 수 있었다.

Table 2-21. Change of the cell count of microorganism contaminated on the vegetable salad stored in the 15℃ of cold chamber

Sample	Test Micro-organisms	Storage Period(days)				
		0	2	4	6	8
Control	Bacteria	<10	7.5x10 ²	4.3x10 ⁴		
	Yeasts & Molds	<10	2.6x10 ²	1.8x10 ⁴		
GTE 0.01%	Bacteria	<10	<10	<10	1.2x10 ²	8.8x10 ³
	Yeasts & Molds	<10	<10	<10	6.5x10	3.7x10 ²
GTE 0.05%	Bacteria	<10	<10	<10	<10	5.5x10
	Yeasts & Molds	<10	<10	<10	1.4x10	2.5x10

* - : good, ± : not good, + : decayed

(2) 축산물 및 수산물

(가) 소고기

진주 중앙시장에서 판매되고 있는 구상으로 마쇄하여 film포장된 소고기를 구입하여 저장실험에 이용하였다. 소고기 박편들을 원형상태로 GTE 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 용액으로 고기표면에 spray하고, 물기를 제거하고 다시 film포장하여 저온저장하면서 총균수를 측정하였다. 대조구는 GTE를 처리하지 않은 소고기를 그대로 사용하였다. 초기 총균수가 7.4이었으나 대조구의 경우, 저장 5시간만에 오염된 미생물이 셀수 없이 많았으며 변패가 시작되었으며, 저장 10시간 경과한 시점부터 부패취와 아울러 표면색도가 갈변하는 것을 확인할 수 있었다. 반면에, GTE용액에 분무처리한 소고기의 경우, 저장 15시간째까지 오염 미생물을 확인할 수 없었으며 저장 20시간째 11.0, 저장 25시간째 25.0, 저장 40시간째 75.4, 저장 50시간째 86.4로 총균수의 증가가 크지 않았으며, 외관상으로도 선도를 유지하고 있었다. Fig. 2-23에서 보는 바와 같이, 대조구의 경우, 2일 경과시에 오염미생물이 셀 수 없을 정도로 급증하여 변패정도가 심화되어 변패취가 강하고 고기근육부가 수축되어 상품가치가 격감하였다. 이에 비하여 GTE처리구의 경우, 외관상이나 관능적으로 변패도가 크지 않아 선도를 그대로 유지하고 있었다.



Fig. 2-23. Photograph of globular beef not-treated (control , A) or treated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of GTE solution(B).

(나) 멸치

구입한 생멸치의 총균수는 29 이었고, 대조구의 경우 저장 3일 경과 후부터 부

패되기 시작하여 오염된 총균수는 2.4×10^2 이었으며 이후 빠른 속도로 증식되어, 저장 4일 후에는 8.0×10^3 로 강한 부패취와 육안으로도 완전한 부패를 확인할 수 있었다. 대조구의 경우 저장 5일째부터는 미생물의 생육이 급증하여 총균수를 측정할 수 없는 정도로 증식되어 변패도가 심화되었다. 한편, GTE용액에 침지처리한 멸치의 경우, 저장 3일째 36, 저장 4일 54, 저장 5일째 67로 저장 7일째까지 총균수의 증가가 크지 않았으며, 외관상으로도 선도를 유지하고 있었다. Fig. 2-24에서 보는 바와 같이, 대조구는 천일건조 2일 경과후, 미생물이 오염되어 표피의 색깔이 흑변화하며 불쾌취를 생성하는 반면, GTE처리구 멸치에서는 색깔의 변화와 불쾌취생성이 일어나지 않은 채, 선도를 유지하고 있었다.



Fig. 2-24. Photograph of anchovy not-treated (control , A) or treated with $50 \mu\text{g/ml}$ of GTE (B) and sun-dried for 2 days.

(3) 농축산물 가공제품

(가) 두부

경남 완사 소재 공장에서 제조한 콩두부를 직접 수거하여 실험재료로 사용하였다. 상온에서 변패의 가능성이 많은 두부를 일정 농도의 GTE용액에 침지시킨 후, 실온(20°C)에서 방치하면서 GTE의 적용 가능성과 보존효과를 비교하여 가장 효과적인 처리농도를 검토하고자 하였다. 저장수조 내에 살균 냉각수와 $50 \mu\text{g/ml}$ 농도의 GTE용액을 별도로 각각 5 L씩을 취하고, 두부 3모씩을 1시간동안 침지시켜 상온에 저장하면서 부패 정도를 비교·확인하였다. 구입한 생두부의 총균수는 1.45×10^2 이었고, 대조구 두부의 경우 저장 20시간 경과 후부터 부패되기 시작하여 오염된 총균수는 셀 수 없는 정도로 증식되었으며, 저장 36시간 후에는 강한 부패취와 아울러, 표피의 갈변정도, 냄새 및 육안으로도 완전한 부패를 확인할 수 있었고, 부패미생물의 증식으로 인한 침지용액의 탁도가 증가하는 것이 확인되었다. 대조구 침지 두부 중 일부를 건져내어 관찰한 결과, Fig. 2-25에서 보는 바와 같이, 상온에서 방

치한지 2일 경과 후, 심한 부패정도를 두부표면에 갈색도가 심한 미생물의 서식상태로 확인 할 수 있었다. 한편, GTE용액에 침지처리한 두부의 경우, 저장 4일까지 침지수조내 용액을 채취하여 오염미생물 검출용 검액으로 사용하여 총균수를 측정한 결과, 저장 1일 7, 저장 2일 44, 저장 3일 1.98×10^2 , 저장 4일 2.35×10^2 로 총균수의 증가가 크지 않았다. Fig. 2-25에서 보는 바와 같이, 두부의 색택 및 선도의 유지 그리고 부패성 미생물의 증식으로 인한 부패방지에 있어서 GTE침지처리가 적절한 처리방법임을 확인할 수 있었다.



Fig. 2-25. Photograph of tofu not-treated (control : A) or treated with 50 $\mu\text{g/ml}$ of GTE solution (B) and stored for 2 days at room temperature.

(나) 수산연제품

수산연제품은 우리나라 독자적인 전통식품이지만 최근에는 고단백 저칼로리 식품이라는 것이나 풍미가 담백한 점이 소비자에게 인식되어서 다양한 상품으로 발전되었다. 대표적인 것에는 게맛살, 어묵 등의 상품이 있으며, 이들은 판매량이 높은 대형상품이다. 또한, 고도불포화지방산이 많이 포함되어있는 빨간살 생선에도 관심을 기울이고 있고 고등어, 정어리, 납치 등을 원재료로 한 제품도 증가하고 있다. 수산연제품은 수분활성이 높고 또 일반의 식품보다 비교적 pH가 높아서 (pH 6-7) 세균의 증식이 유리한 조건이라 부패하기 쉽다. 수산연제품중에서 시제품으로 제조되어 포장제품으로 판매가 활발하게 진행되고 있는 찢 어묵에 대한 GTE의 처리효과는 Table 2-22와 같다. 즉, 무처리구인 대조구 찢 어묵은 저장 1일째부터 변패취가 나타나 그 이후, 빠른 변패도를 보인 반면, GTE처리구는 선도유지기간이 크게 연장되어 뚜렷한 처리효과를 나타내었다. 찢 어묵은 식감을 중시하기 때문에 pH를 저하시키지 않아야 할 입장에서, pH 조정제를 포함하지 않을 경우를 고려할 때, GTE제제와 기존 상용보존료와의 병용을 권장하고 싶다.

Table 2-22. Sensory evaluation result of cooked fish paste during storage period in the preservation temperature of 15-18°C.

Test Sample (%)	Storage Period(days)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control	±	+	+						
GTE 0.01%	-	-	-	±	+	+			
GTE 0.05%	-	-	-	-	-	±	+	+	

* - : good, ± : not good, + : decayed

식품을 보관하기 위하여 식염, 설탕 등을 멀리하여 저염, 저당식품이 선호되고 있는 상황이며 이전의 보존식이라 볼 수 있는 절임류 등도 저염, 저당화 때문에 보존성이 저하되어 가고 있다. 그러나, 이들의 식품에 보존성을 부여하기 위하여 첨가한 합성보존료도 소비자가 멀리하는 경향이 있고, 식품제조를 담당하고 있는 사람들에게 매우 어려운 상태가 되었다. 이와 같은 현상에서 식품의 위생관리를 하는 경우 제조공정 중 미생물오염, 제조자의 위생의식 등 모든 요소에 대하여 관심을 가질 필요가 있다는 것은 말할 필요가 없다. 천연계 보존료도 이들의 요소 중 하나이다. 이러한 동기에서 GTE의 활용은 자연스러운 입장이며, 농축수산물 식품원료의 수확, 도살 및 어획 후 저장 중에 변패미생물의 오염 및 성장으로 발생하는 영양성분의 파괴, 외관 및 신선도의 상실 등 변패현상을 방지하기 위한 수단으로 GTE 처리방법은 탁월한 효과를 나타내었다. 아울러, 저렴하고 처리기술이 간단한 점 등 여러 가지 잇점이 있으므로 산지농가에 보급, 활용함으로써 농가소득 증대에 크게 기여 할 것으로 추측된다. 또한 농축수산 가공식품의 보존제로서도 그 효과가 우수하여 각종 가공식품의 저장성을 향상시키기 위한 식품첨가물로서의 개발도 의미가 있을 것이다.

제 3 절 저장 방법에 따른 녹차제품의 생리활성능(뇌 신경질환) 변화 조사

1. 연구개발 수행 내용

가. 녹차 저장 조건 및 방법

경남 하동군 악양면의 (주)햇차원 (참여기업)에서 제조한 분말 녹차 및 잎녹차를 20℃에서 수분활성도 0.81, 0.69 그리고 0.23에서 1~4주 동안 저장하여 그 활성을 측정하였다. 다만 일반적으로 유통되는 녹차 제품의 수분활성도가 0.81 정도이므로 이를 중심으로 저장 기간별 신경세포 보호효과를 측정하였다.

나. 녹차 추출액 제조

수분활성도 0.81의 1~4주 저장 녹차는 일반적으로 음용되는 아래 조건으로 물 추출을 시행하였고, 이를 진공 농축과 동결 건조를 시행하여 녹차 추출액을 제조하였다 (Table 3-1). 제조된 동결 건조된 추출물은 -20℃ 냉동고에서 보관하면서 연구에 사용하였다.

Table 3-1. Condition of green tea extraction

green tea	distilled water	extraction temperature	extraction time
1.5 g	100 mL	70℃	5 min

다. 신경세포 배양

신경세포로는 PC12 cell line을 활용하였다. ATCC에서 분양 받은 PC12 cell은 10% horse serum, 5% fetal bovine serum 그리고 1% antibiotic- antimycotic를 첨가한 RPMI 1640 medium에서 배양하였다. 배양 조건은 37℃, 5% CO₂ 조성이었다.

라. 신경세포사멸에 대한 보호 효과 측정 (A β -induced neurotoxicity에 대한 보호 효과)

뇌신경 퇴화 증상과 산화적 스트레스 (oxidative stress)가 발생하는 노인성 치매(Alzheimer's disease; AD) 환자의 뇌 조직은 A β 단백질의 침착과 깊이 연관되어 있음이 보고되어지고 있다 (Kang et al., 2007). 비록 A β 단백질에 의한 oxidative stress형성에 대한 과정은 명백하게 밝혀지고 있지는 못하지만, A β 단백질은 뇌신경세포에 접촉하거나 침투하여 oxidative stress-induced neurotoxicity를 유발시키는 것으로 알려지고 있다. 결국 A β 단백질이 퇴행성 뇌신경 질환 (AD 등)의 주요 유발원으로 알려지고 있고 그 neurotoxicity의 원인이 oxidative stress로 밝혀지고 있어 A β -induced neurotoxicity에 대한 녹차의 신경세포 보호 효과를 측정하고자 하였다.

(1) 분말 녹차의 보호 효과

A β -induced neurotoxicity에 대한 보호 효과는 MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction assay로 측정하였다. 저장기간별 (1~4주) 녹차 추출물은 100 μ g/mL의 농도로 PC12 cell line에 48시간동안 pre-incubation 하였고, 그 후 A β 는 10 μ M의 농도로 24시간 incubation하였다. 이 상태의 PC12 cell에 MTT stock solution (10 μ L/well)을 처리하여 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 incubation 시킨 후, DMSO 150 μ L를 활용하여 반응을 종결시켰다. 마지막으로 흡광도는 microplate reader에서 570 nm (determination)와 630 nm (reference wave)에서 측정하였다. 대조구 (positive control)는 vitamin C (100 μ M)를 사용하였고, cell viability는 control에 대한 % concentration으로 나타났다.

(2) 잎 녹차의 보호 효과

A β -induced neurotoxicity에 대한 잎 녹차의 신경세포 보호효과 역시 MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction assay로 측정하였다. 분말녹차의 경우와 동일한 방법으로 실험하였고 흡광도는 microplate reader에서 570 nm (determination)와 630 nm (reference wave)에서 측정하였다.

마. 신경세포 막 손상에 대한 보호 효과 측정

(1) 분말 녹차의 세포막 보호 효과

A β -induced neurotoxicity에 대한 세포막 보호 효과는 LDH (Lactate dehydrogenase) assay로 측정하였다. 저장기간별 (fresh~4 weeks group) 녹차 추출물은 100 μ g/mL의 농도로 PC12 cell line에 48시간동안 pre-incubation 하였고, 그 후 A β 는 10 μ M의 농도로 48시간 incubation 하였다. 배양 후 이 상태의 culture medium과 증류수를 혼합하고 다시 assay mixture를 혼합하여 20분간 incubation하였다. 1N-HCl 10 μ L를 활용하여 반응을 종결시킨 후, 흡광도는 490 nm (determination) 와 690 nm (reference)에서 측정하였다. 대조구 (positive control)는 vitamin C (100 μ M)를 사용하였고, cell viability는 control에 대한 % concentration으로 나타냈다.

(2) 잎 녹차의 세포막 보호 효과

A β -induced neurotoxicity에 대한 세포막 보호 효과는 분말 녹차의 경우와 같이 LDH (Lactate dehydrogenase) assay로 측정하였다. 저장기간별 잎 녹차 추출물은 100 μ g/mL의 농도로 PC12 cell line에 48시간동안 pre-incubation 하였고, 그 후 A β 는 10 μ M의 농도로 48시간 incubation하였다. 나머지 실험은 상기 방법과 동일한 조건으로 수행하였다. 대조구 (positive control)는 100 μ M vitamin C를 사용하였고, cell viability는 control에 대한 % concentration으로 나타냈다.

바. 저장 조건에 따른 항산화 효과 변화 측정

퇴행성 뇌신경질환으로서의 노인성 치매의 가장 중요한 발병원인은 신경세포의 사멸에서 기인되는 것으로 보고되고 있다. 치매를 유발하는 뇌 신경세포의 사멸은 amyloid- β protein (A β)에 의한 신경세포 독성에 의해 나타나는데, 이때의 신경세포 독성은 A β -induced oxidative stress로 알려지고 있다. 그러므로 노인성 치매 연구에 있어서 각종 시료에 대한 항산화 연구는, 알츠하이머성 치매 질병의 발생을 예방할 수 있는 소재 연구에 매우 유용하게 활용될 수 있어 다음 몇 가지의 관련 실험을 수행하였다.

(1) 환원력 측정

추출물 2.5 mL에 sodium phosphate buffer(2.5 mL, 200 mM, pH 6.6)와 1% potassium ferricyanide(2.5 mL)를 혼합시킨 후 혼합물을 50°C에서 20분 동안 배양시킨 다음 trichloroacetic acid(2.5 mL, 10%, w/v)를 첨가하여 650 × g에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리한 상정액(5 mL)에 탈이온수(5 mL)와 1% ferric chloride 1 mL를 첨가시킨 후 UV-spectrophotometer(Shimadzu UV-1601, Japan)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) DPPH radical scavenging activity

에탄올로서 1.5×10^{-4} M 농도가 되게 한 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)용액 4 mL씩을 vortex로 균일하게 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도(optical density, O.D.)를 측정하였다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = 1 - \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

(3) FRAP

이 방법은 colored ferrous tripyridyl triazine complex에 의해 ferric ion이 ferrous로 전환되어지는 과정을 분석함으로써 시료 내의 총 항산화력을 측정하는 방법이다. 사용되는 시약은 300 mM sodium acetate buffer (pH 3.6)와 2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) reagent, 그리고 20 mM FeCl₃이며, TPTZ reagent는 10 mM의 TPTZ를 40 mM HCl에 용해시켰다. Acetate buffer, TPTZ reagent 및 FeCl₃ solution을 혼합하여 (10 : 1 : 1, v/v/v) 37°C에서 10~15분간 incubation 시켜두었다. 차 추출물과 pre-warmed working FRAP reagent를 96-well plate에 분주한 후 약 15분간 incubation시키고 microplate reader (Biorad 3055, Sweden)를 사용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

사. 뇌신경전달물질 (acetylcholine) 분해효소 (acetylcholinesterase)에 대한 저해효과 측정

퇴행성 뇌신경질환으로 알려진 치매는 인지능력과 학습능력을 저하시키는 초기 임상학적인 특징을 갖고 있다. 이는 뇌 신경세포에서 신호전달

에 관여하는 신호전달 물질 (neurotransmitter)로서의 acetylcholine의 역할에 기인되는데, 치매 환자의 경우 정상인에 비해 acetylcholine의 농도가 매우 낮은 것으로 보고되고 있다 (Choi et al., 2004). Acetylcholine은 뇌 신경세포에서 두 가지 효소에 의해 분해와 합성이 조절되는데 에 관여하는 효소로는 분해효소로서의 acetylcholinesterase (AChE)와 합성 효소로서의 choline-acetyltransferase (ChAT)가 존재한다. 이러한 이유로, 현재 치매 환자의 인지능력과 학습능력의 저하를 억제시키는 약품으로 acetylcholinesterase inhibitor (AChEi)가 시판되고 있는 실정이다. 그러나 현재 시판되는 상당수의 약물이 간 독성 등의 부작용을 나타낸다는 보고가 있어 인체의 적용에 많은 제약이 존재하고 있다. 또한 치매를 예방하거나 치료할 수 있는 약물은 현재로서는 거의 전무하며 상기 약품 (AChEis)도 그 증상을 일부 완화시키거나 억제하는 등의 제한적인 효과를 나타내고 있다. 결국 식품자원에서 부작용 우려가 없는 기능성식품 또는 기능강화 식품의 형태로 치매를 조절할 수 있다면 이는 국민보건 및 건강 증진에 큰 영향을 줄 수 있고, 관련 작물의 재배농가의 소득 증대에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

Acetylcholinesterase저해 활성 측정은 acetylcholine iodide를 기질로 사용하여 Ellman법으로 측정하였다. 효소는 PC12 세포배양액 1 mL에 균질화를 위한 buffer (1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 1% Triton X-100혼합액에 10 mM Tris-HCl로 pH 7.2조정) 5 mL를 첨가하여 Glass-Col homogenizer로 균질화한 후 균질화된 세포배양액을 10,000 rpm에서 30분 동안 원심분리 하였으며, 그 상정액을 효소실험을 위하여 사용하였다. 모든 추출공정은 4°C에서 수행하였으며, 추출한 효소액의 단백질함량을 측정하기 위하여 BCA kit(bicin-choninic acid; Sigma Co., USA)를 이용하였고, bovine serum albumin으로 작성한 검량곡선에 준하여 함량을 환산하였다. 정제효소(단백질 함량 : 2.38 mg/mL) 10 µL에 추출물 10 µL를 넣어 37°C에서 15분간 반응시켰으며, 반응 혼합물에 50 mM sodium phosphate buffer(pH 8.0)에 용해시킨 Ellman's reaction mixture [0.5 mM acetylthiocholine, 1 mM 5,5'-dithio-bis (2-nitro benzoic acid)] 70 µL를 첨가한 후 405 nm에서 10분 동안 2분 간격으로 흡광도를 측정하였다.

2. 연구개발 수행 결과

가. 신경세포사멸에 대한 보호 효과 측정 ($A\beta$ -induced neurotoxicity에 대한 보호 효과)

(1) 분말 녹차의 보호 효과

PC12 cell viability는 $A\beta$ 처리에 의해 control group (100%) 대비 78%를 나타냈고 $A\beta$ -induced neurotoxicity는 vitamin C에 의해 89%로 약 11% 정도의 신경세포 보호 효과를 보였다 (Fig. 3-1). 또한 저장에 들어가기 전의 fresh group (98%)과 저장 1 week group (102%)의 분말 녹차 추출물이 vitamin C보다 높은 세포 보호 효과(9~11%)를 나타냈고 그 신경세포 보호효과는 control group에 버금가는 것으로 나타났다. 반면 저장기간이 길어질수록 (2~4 weeks groups) $A\beta$ -induced neurotoxicity에 대한 신경세포 보호효과는 상대적으로 낮아지는 결과 (78~82%)를 보였다. 2~4 weeks groups의 cell viability가 상대적으로 낮고 $A\beta$ -induced neurotoxicity에 대한 신경세포 보호효과를 거의 보이지 못한 이유는 녹차 함유 active-catechin류의 함량변화 보다는 저장기간 중 그 활성이 낮아진 것으로 사료된다. 그러므로 정확한 결과를 도출하기 위해서는 녹차에 함유된 catechin류 중 약 65% 정도 함유된 것으로 알려진 epigallocatechin gallate (EGCG)를 동정하여 저장기간에 따른 함량변화, 신경세포 보호효과 및 항산화 활성 등의 연구가 수행되어야 한다.

(2) 잎 녹차의 보호 효과

PC12 cell viability는 $A\beta$ 처리에 의해 control group (100%) 대비 78%를 나타냈고 $A\beta$ -induced neurotoxicity는 vitamin C에 의해 89%로 약 11% 정도의 신경세포 보호 효과를 보였다 (Fig. 3-2). 또한 저장에 들어가기 전의 fresh group (98%)과 저장 1 week group (99%)의 잎 녹차 추출물이 vitamin C보다 높은 세포 보호 효과 (9~10%)를 나타냈고 그 신경세포 보호효과는 분말 녹차의 경우와 같이 control group에 버금가는 것으로 나타났다. 반면 저장기간이 길어질수록 (2, 4 weeks groups) $A\beta$ -induced neurotoxicity에 대한 신경세포 보호효과는 상대적으로 낮아지는 결과 90%내외를 보였다. 그러나 잎 녹차의 경우 3 weeks group의 cell viability가 가장 높게 나타났다. 또한 2, 4 weeks groups의 경우도 분말 녹차 대비 8~10%정도 높게 나타났다. 이 결과에 대한 구체적인 원인을 밝히기 위해서는 향후 저장 기간별 EGCG (active-catechin류 중 지표성분)의 동정을 통한 함량변화 및 활성 측정 등의 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

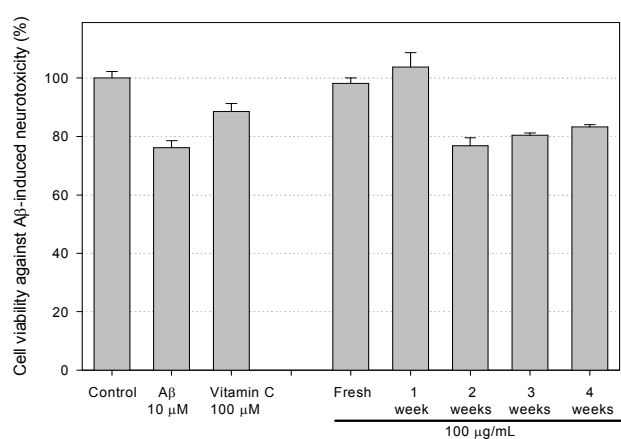


Fig. 3-1. Protective effect of green tea (powder form) hot-water extract against Aβ-induced cell death in PC12 cells. Control, untreated control cultures; Fresh~4 weeks, storage life of green tea. Results shown are means ± SD ($n = 3$) and significant difference ($P < 0.05$) was observed.

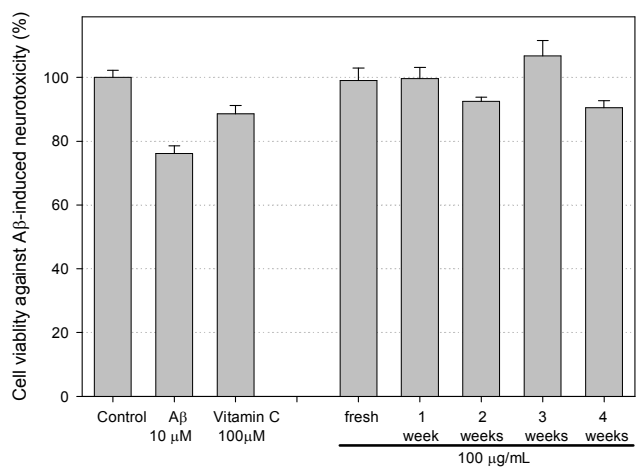


Fig. 3-2. Protective effect of green tea (leaf form) hot-water extract against Aβ-induced cell death in PC12 cells. Control, untreated control cultures; Fresh~4 weeks, storage life of green tea. Results shown are means ± SD ($n = 3$) and significant difference ($P < 0.05$) was observed.

나. 신경세포 막 손상에 대한 보호 효과 측정

A β -induced neurotoxicity에 대한 녹차 (분말, 잎) 추출액의 신경세포 보호효과를 위에서 관찰하였다. 그 결과 분말 녹차와 잎 녹차 모두 짧은 저장기간 (fresh, 1 week group)의 것이 상대적으로 우수한 보호효과를 갖는 것으로 나타났다. 또한 신경세포의 경우 상대적으로 많은 lipid 성분을 함유하고 있고 이는 산화적인 스트레스에 매우 취약한 구조적 특성이므로 상기의 신경세포 보호효과와 신경세포막과의 관계를 알아보려고 다음의 연구를 진행하였다.

(1) 분말 녹차의 세포막 보호 효과

A β 처리에 의해 PC12 cell membrane 파괴로 인한 LDH release는 control group 대비 20% (membrane destruction)가 높게 나타났고, A β -induced membrane destruction은 vitamin C에 의해 control group 수준으로 낮아짐으로서 신경세포막 보호효과를 보여주었다 (Fig. 3-3). 특히 저장기간별 녹차 추출물 (fresh~4 weeks groups)에 의한 신경세포막 보호효과도 관찰되었는데, 그 정도는 비교적 고르게 나타났다. 특히 저장 3, 4 weeks groups은 가장 높은 세포막 보호 활성을 보여 주었다. 이는 신경세포 독성에 대한 신경세포 보호의 결과와는 다소 상반되는 내용으로 이에 대한 보다 구체적인 연구가 필요할 것으로 판단된다. 단지 MTT assay와 LDH assay의 실험적인 특징에 의해 나타나는 결과인지 아니면 내부 구성물로서의 phenolic compounds에 의한 원인인지는 분명하지 않다. 또한 분말 녹차 추출물이 저장기간에 크게 관계없이 vitamin C보다도 높은 신경세포막 활성 (PC12 cell 외부로의 LDH release 저해능력)을 보여주었는데, 이 역시 저장기간별 phenolics 특성 변화에 대한 추가적인 연구가 병행되어야 할 것으로 보인다.

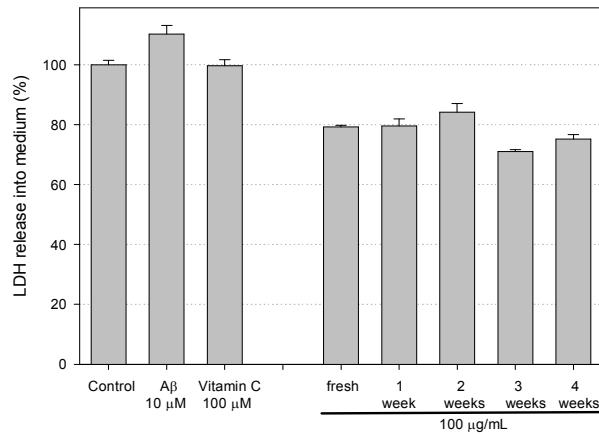


Fig. 3-3. Inhibition effect of LDH release of green tea (powder form) hot-water extract on Aβ-induced membrane damage in PC12 cells. Control, untreated control cultures; Fresh~4 weeks, storage life of green tea. All data are presented as the means ± SD ($n = 3$). Statistical analysis indicated that the influence of extracts used had significant effect on Aβ-induced membrane toxicity (LDH release) ($P < 0.05$).

LDH assay를 통해 분말 녹차 추출물의 Aβ-induced neurotoxicity에 대한 세포막 보호 효과를 확인하기 위해 trypan blue dye exclusion assay를 추가로 수행하였다. 저장기간별 (fresh~4 weeks group) 녹차 추출물은 100 μg/mL의 농도로 PC12 cell line에 48시간동안 pre-incubation 하였고, 그 후 Aβ는 10 μM의 농도로 24시간 incubation하였다. 배양 후 이 상태의 PC12 cell과 0.4% trypan blue dye를 동량으로 하여 10분간 incubation 하고, 이를 optical microscope를 통해 viable cell수를 counting하였다. 대조구 (positive control)는 역시 동일하게 vitamin C (100 μM)를 사용하였다. Control group이 다른 assay와 달리 100%가 아닌 것은 optical microscope로 관찰하여 전체 세포 중 viable cell만을 counting하여 %로 나타냈기 때문이다. 결국 Aβ 처리에 의해 PC12 cell membrane 파괴로 인한 trypan blue dye staining cell은 그렇지 못한 cell에 비해 사멸된 것으로 판단하였다.

Control group은 전체 세포 중 90%정도가 viable cell로 나타났고 전체 중 10%만이 실험 기간 중 자연 사멸되는 결과를 보여주었다. 반면 Aβ를 처리한 group은 control group 대비 13%의 신경 세포사멸을 유발하였고, Aβ-induced membrane destruction은 vitamin C (91%)에 의해 control

group 수준으로 회복됨으로서 신경세포막 보호효과를 보여주었다 (Table 3-2). 저장기간별 녹차 추출물 (fresh~4 weeks groups)에 의한 신경세포막 보호효과도 관찰되었는데, 그 효과는 vitamin C의 효과와 전체적으로 유사하게 나타났으며 신경세포막 보호효과의 정도도 비교적 고르게 나타나는 특징을 보여주었다.

Table 3-2. Protective effects of green tea (powder form) hot-water extract on A β -induced membrane damage in PC12 cells

Control	A β 10 μ M	Vitamin C 100 μ M	fresh	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks ¹
			100 μ g/mL ²				
90.3 \pm 2.3 ³	77.9 \pm 0.6	91.0 \pm 1.6	93.3 \pm 1.8	95.6 \pm 1.1	93.5 \pm 1.5	94.9 \pm 1.5	96.2 \pm 2.4

Vitamin C (100 μ M) was applied as positive control. Data are presented as mean \pm SD for 1 representative triplicate determination and are expressed as the percent survival compared to the corresponding controls ($P < 0.05$). *Aw 0.83, ¹storage life, ²sample concentration, ³% value

(2) 잎 녹차의 세포막 보호 효과

A β 처리에 의해 PC12 cell membrane 파괴로 인한 LDH release는 control group 대비 20% (membrane destruction)가 높게 나타났고, A β -induced membrane destruction은 vitamin C에 의해 control group 수준으로 낮아짐으로서 신경세포막 보호효과를 보여주었다 (Fig. 3-4). 특히 저장기간별 녹차 추출물 (fresh~4 weeks groups)에 의한 신경세포막 보호효과도 관찰되었는데, 저장 1주 (1 week group)의 잎 녹차 추출물이 상대적으로 높은 신경세포막 보호효과를 가지고 있는 것으로 나타났다. 또한 분말 녹차 추출물의 결과와 유사하게 저장기간에 크게 관계없이 vitamin C보다도 높은 신경세포막 활성 (PC12 cell 외부로의 LDH release 저해능력)을 보여주었는데, 이 역시 저장기간별 phenolics 특성 변화에 대한 추가적인 연구가 병행되어야 할 것으로 보인다.

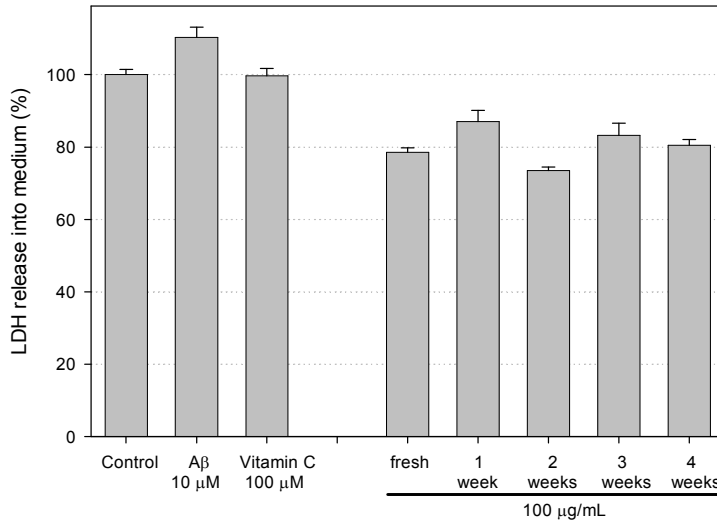


Fig. 3-4. Inhibition effect of LDH release of green tea (leaf form) hot-water extract on A β -induced membrane damage in PC12 cells. Control, untreated control cultures; Fresh~4 weeks, storage life of green tea. All data are presented as the means \pm SD ($n = 3$). Statistical analysis indicated that the influence of extracts used had significant effect on A β -induced membrane toxicity (LDH release) ($P < 0.05$).

LDH assay를 통해 잎 녹차 추출물의 A β -induced neurotoxicity에 대한 세포막 보호 효과를 확인하기 위해 역시 동일하게 trypan blue dye exclusion assay를 추가 수행하였다.

Control group은 전체 세포 중 90%정도가 viable cell로 나타났고 전체 중 10%만이 실험 기간 중 자연 사멸되는 결과를 보여주었다. 반면 A β 를 처리한 group은 control group 대비 13%의 신경 세포사멸을 유발하였고, A β -induced membrane destruction은 vitamin C (91%)에 의해 control group 수준으로 회복됨으로서 신경세포막 보호효과를 보여주었다 (Table 3-3). 저장기간별 잎 녹차 추출물 (fresh~4 weeks groups)에 의한 신경세포막 보호효과도 역시 관찰되었는데, 그 효과는 분말 녹차 추출물의 경우와 같이 vitamin C의 효과와 전체적으로 유사하게 나타났다. 그리고 PC12 cell에 대한 신경세포막 보호효과의 정도도 비교적 고르게 나타나는 특징을 보여주었으나 잎 녹차 추출물이 분말 녹차 추출물보다 상

대적으로 높은 활성을 갖는 것으로 나타났다.

Table 3-3. Protective effects of green tea (leaf form) hot-water extract on A β -induced membrane damage in PC12 cells

Control	A β 10 μ M	Vitamin C 100 μ M	fresh	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks ¹
			100 μ g/mL ²				
90.3 \pm 2.3 ³	77.9 \pm 0.6	91.0 \pm 1.6	95.4 \pm 3.4	96.3 \pm 1.1	95.9 \pm 2.4	96.7 \pm 2.2	97.9 \pm 2.5

Vitamin C (100 μ M) was applied as positive control. Data are presented as mean \pm SD for 1 representative triplicate determination and are expressed as the percent survival compared to the corresponding controls ($P < 0.05$). *Aw 0.83, ¹storage life, ²sample concentration, ³% value

결론적으로, 신경세포 (PC12 cell)를 활용하여 A β -induced neurotoxicity에 대한 저장 기간별 녹차 추출물의 결과는 다음과 같이 요약할 수 있다. 저장기간에 따라 분말 녹차 추출물과 잎 녹차 추출물 모두 의미 있는 신경세포 보호효과가 관찰되었다. 그러나 현재의 저장 조건 (수분활성도: 0.81, 저장기간: 전체 4주)에서는 신경세포에 대한 보호효과의 차이는 그 차이가 크지 않은 것으로 판단된다. 다만 분말녹차의 경우 상대적으로 유용성분의 추출 효율성이 우수한 것으로 판단되어 그 결과에 있어 비교적 일관된 양식을 보이는 것으로 판단된다.

특히 신경세포 사멸에 대한 보호효과를 나타내는 MTT assay의 경우, 분말 녹차 추출물은 저장기간이 짧은 것 (fresh, 1 week group)이 높은 보호효과를 나타낸 반면 잎 녹차 추출물은 저장기간이 짧은 것 (fresh, 1 week group)과 함께 3 weeks group도 높은 보호효과를 보여주었다. 이 결과가 단순히 추출 효율에 의한 원인인지 아니면 active-catechin류의 함량변화 및 활성 능력 변화 등에 의한 것인지는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

다. 저장 조건에 따른 항산화 효과 변화 측정

녹차 sample을 확보한 직후인 'Fresh'부터 각각의 수분활성도별 (A_w 0.81, 0.69, and 0.23)로 4주까지 저장하면서 1주 간격으로 녹차 잎과 분말 추출물에 대한 항산화 실험을 실시하였다. 그러나 환원력, DPPH/ABTS radical scavenging activity, FRAP assay, 그리고 superoxide anion radical scavenging activity에서의 결과는 저장기간 (fresh~4 weeks)과 수분활성도별 차이를 구분할 수 없는 정도였다. 결국 저장기간을 3개월로 재조정하고, 저장 조건에서 저장온도 (상온, 4°C , and -20°C)조건을 추가로 구성하여 다음 3가지 실험을 진행하였다.

(1) 환원력 측정

(가) 잎 녹차의 환원력

3개월간 상온, 냉장 (4°C), 그리고 냉동 (-20°C)에서 저장한 녹차 잎 열수 (70°C)추출물의 농도를 각각 달리하여 첨가한 후 금속이온을 환원시키는 환원력을 측정한 결과는 다음 (Fig. 3-5 ~ 3-7)과 같다. 환원력에서의 흡광도 수치는 그 자체가 시료의 환원력을 나타내며, 높은 항산화 활성을 가지는 대조구는 흡광도의 수치가 높게 나타난다. 세 가지 저장온도에 관계없이 15~250 $\mu\text{g/mL}$ 까지는 추출물의 농도가 점진적으로 증가함에 따라 환원력이 증가하는 경향을 보였으며, 500 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서는 환원력의 증가 정도가 매우 현저하게 높아지는 것을 볼 수 있었다. 특히 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 가장 높은 항산화 활성으로서의 환원력이 나타남을 알 수 있었다. 또한 수분활성도에 의한 차이도 저장온도에 의한 결과와 유사하게 나타났다. 다만 냉장저장 (4°C)조건인 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 수분활성도 0.23의 열수 추출물이 상대적으로 가장 우수한 환원력을 나타내는 것으로 보인다. 그러나 상온과 냉동 조건에서는 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 유사한 pattern을 보이고 있으며, 가장 높은 환원력의 수분활성도 조건은 0.69로 나타났다.

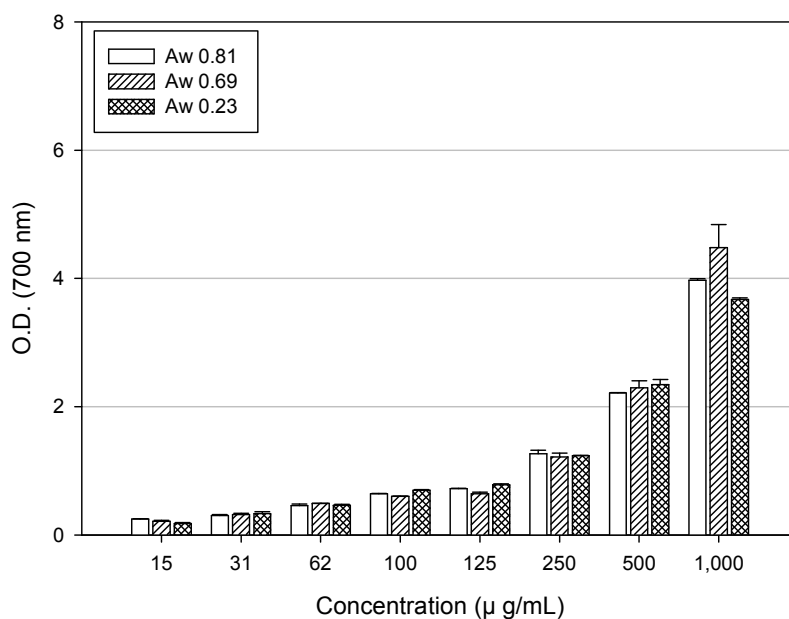


Fig. 3-5. Reducing power of 70°C distilled water extracts from green tea leaves. The reducing power was performed after 3 months storing at room temperature. Values represent the means ($n = 3$) \pm S.D.

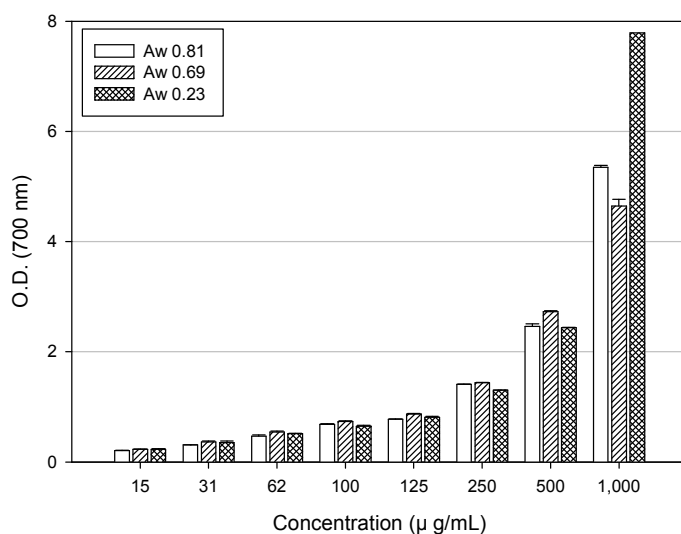


Fig. 3-6. Reducing power of 70°C distilled water extracts from green tea leaves. The reducing power was performed after 3 months storing at 4°C. Values represent the means ($n = 3$) \pm S.D.

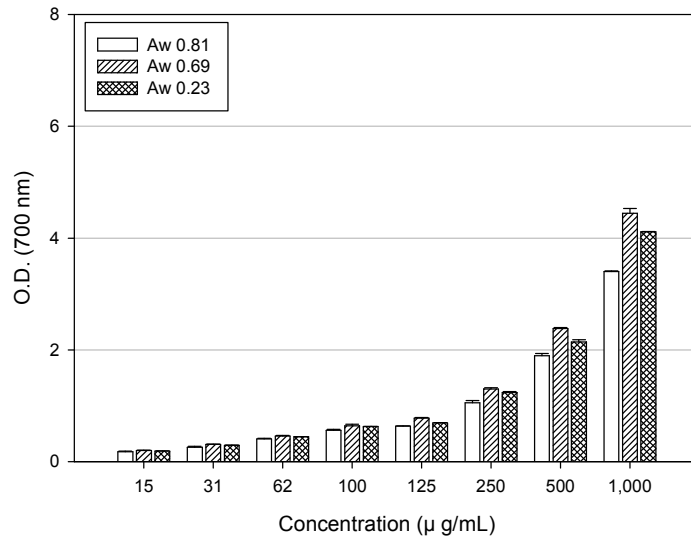


Fig. 3-7. Reducing power of 70°C distilled water extracts from green tea leaves. The reducing power was performed after 3 months storing at -2 0°C. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

(나) 분말 녹차의 환원력

분말 녹차 추출물도 잎 녹차의 경우와 같이 동일한 저장조건(저장기간, 저장온도, 그리고 수분활성도)을 갖고 실험 결과를 도출하였다. 분말 녹차도 70°C 열수 추출물의 농도를 15~1,000 µg/mL까지 다양하게 준비하여 금속이온을 환원시키는 환원력을 측정하였다 (Fig. 3-8 ~ 3-10). 초기 농도부터 125 µg/mL까지는 녹차 잎 추출물의 결과와 유사한 pattern을 보였다. 저장온도와 수분활성도에 크게 영향을 받지 않고, 농도 비례적인 환원력의 증가를 보여주었다. 그러나 녹차 잎 추출물에 비해 250 µg/mL 농도 이상에서는 극적인 환원력의 상승 곡선을 나타냈다. 특히 1,000 µg/mL에서는 녹차 잎 추출물 대비 약 1.5~2배에 해당하는 환원력 상승이 있었고, 더불어 수분활성도의 차이에 따른 결과를 보여주지는 못했다.

녹차 잎에 비해 녹차 분말의 추출물에서의 환원력 증가가 상대적으로 우수하게 나타났고 그 차이는 500 µg/mL 이상에서 더욱 뚜렷하게 나타났다. 이는 추출 조건에서 녹차 분말이 추출 용매 (70°C distilled water) 와 반응할 수 있는 면적이 상대적으로 우수하여 생리활성 물질로서의

phenolic compounds (catechins 포함) 용출량이 많은 것에서 기인된 것으로 추측된다. 또한 녹차의 주요 생리활성 성분은 catechins으로 알려지고 있으며, 6종류의 catechin isoforms 중에서 EGCG (epigallocatechin gallate) 성분이 약 65%를 차지하는 것으로 알려지고 있다 (Lee 2008; Pilar et al., 2008; Shon et al., 2004). 더불어 녹차 catechins 중에서 EGCG의 항산화력이 ECG (epicatechin gallate) 다음의 두 번째인 것으로 보고 (Wang et al., 2001; Choi et al., 2003)되고 있으므로 해당 환원력의 증가는 EGCG에 의한 항산화 효과로 사료된다. 물론 녹차 잎 추출물의 실험결과 중 냉장 저장조건의 결과 (Fig 3-6)에서 1,000 ug/mL의 수분활성도의 영향에 대한 정확한 기작을 살피기 위해서는 추출물에 포함된 생리활성성분의 동정과 냉장 조건에서의 그 구조적 변화와의 관계를 살피는 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다. 그러나 이 결과도 분말 녹차 추출물의 냉장조건의 결과와 비교해볼 때 큰 의미를 갖지는 못할 것으로 사료된다.

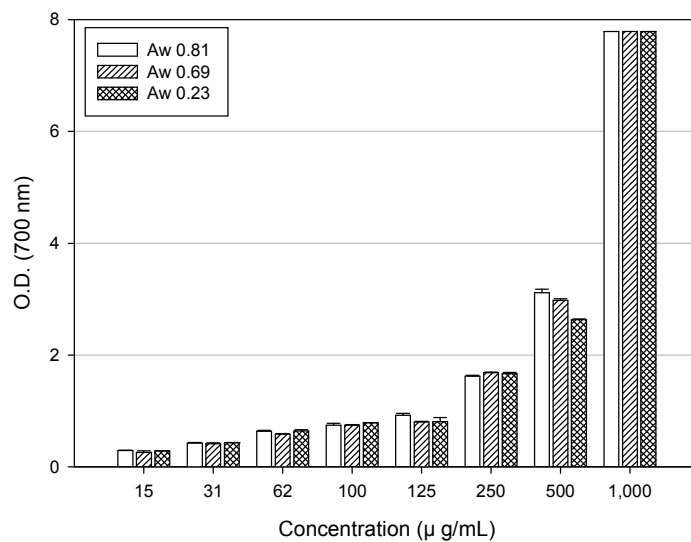


Fig. 3-8. Reducing power of 70°C distilled water extracts from green tea powder. The reducing power was performed after 3 months storing at room temperature. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

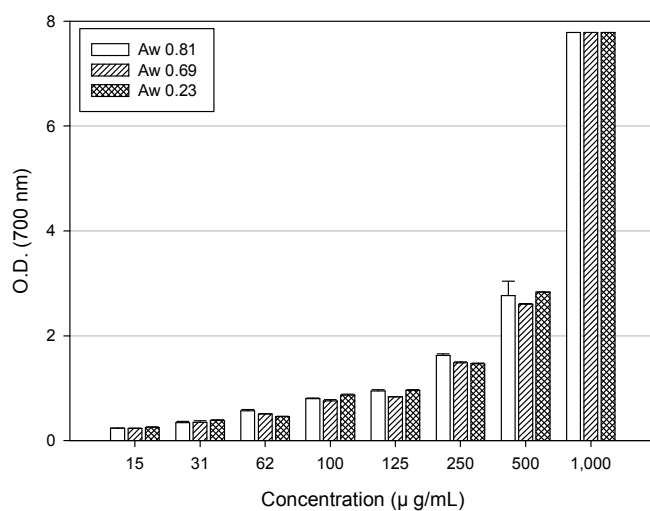


Fig. 3-9. Reducing power of 70°C distilled water extracts from green tea powder. The reducing power was performed after 3 months storing at 4°C. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

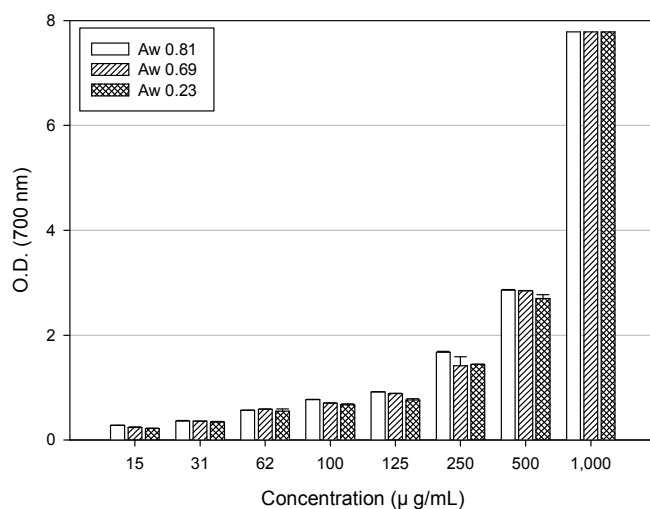


Fig. 3-10. Reducing power of 70°C distilled water extracts from green tea powder. The reducing power was performed after 3 months storing at -20°C. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

(2) DPPH Radical scavenging assay

(가) 잎 녹차의 DPPH radical scavenging activity

녹차 잎 열수 추출물 (70°C distilled water)을 이용하여 DPPH radical scavenging activities를 측정한 결과는 다음 (Fig. 3-11 ~ 3-13)과 같고, DPPH radical scavenging activity 측정을 위한 조건은 농도별 처리 조건을 포함하여 상기한 것과 동일하다. 저장온도 및 수분활성도에 관계없이 125 ug/mL까지는 농도 의존적으로 radical scavenging activity가 증가하는 것으로 보이고, 그 이상의 농도 (250~10,000 ug/mL)에서는 약 80~90% 정도의 최대 라디칼 소거활성을 나타냈지만 더 이상 농도의존적인 활성 증가 pattern을 보이지는 않았다. 또한 최대 활성 범위에서 수분활성도에 따른 차이는 통계적 유의차가 없는 범위에 있는 것으로 나타났다.

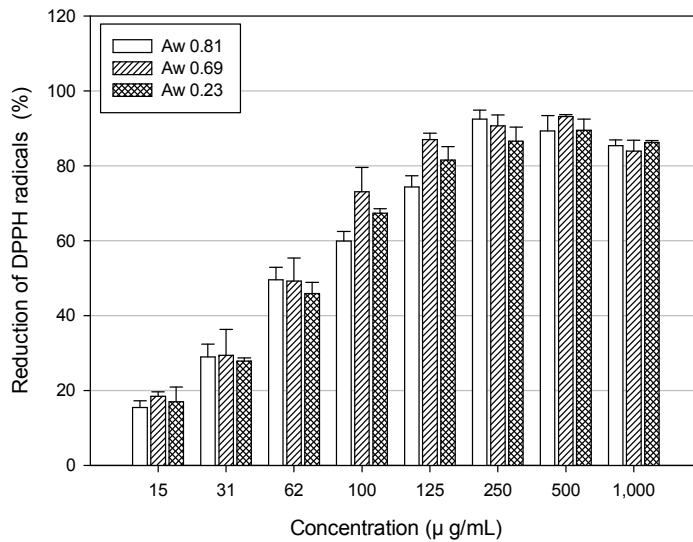


Fig. 3-11. DPPH radical scavenging activities of 70°C distilled water extracts from green tea leaves. The DPPH radical scavenging activities was performed after 3 months storing at room temperature. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

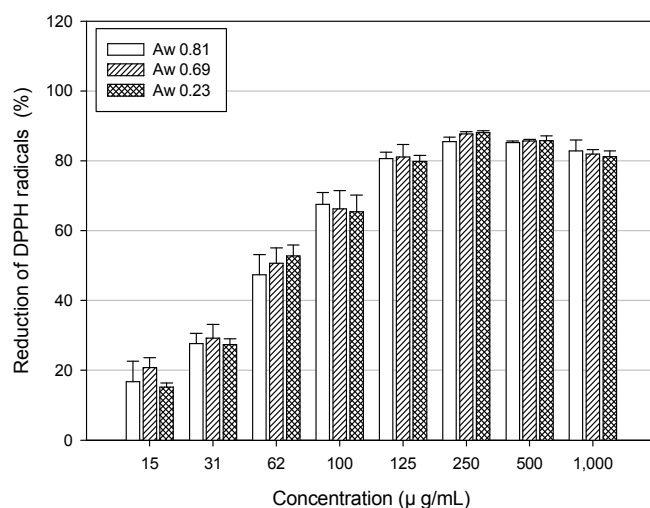


Fig. 3-12. DPPH radical scavenging activities of 70°C distilled water extracts from green tea leaves. The DPPH radical scavenging activities was performed after 3 months storing at 4°C. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

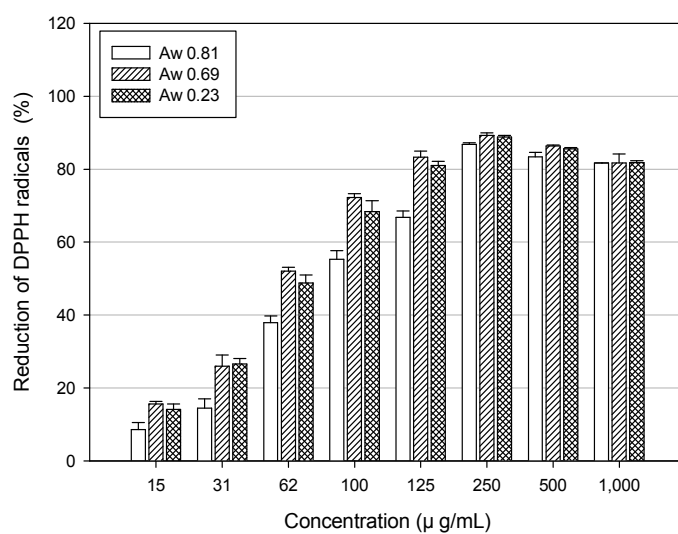


Fig. 3-13. DPPH radical scavenging activities of 70°C distilled water extracts from green tea leaves. The DPPH radical scavenging activities was performed after 3 months storing at -20°C. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

(나) 분말 녹차의 DPPH radical scavenging activity

분말 녹차의 열수 추출물도 동일한 조건에서 DPPH radical scavenging activity를 측정하였다. 초기 설정 농도인 15 ug/mL부터 100 ug/mL까지는 저장온도와 수분활성도의 조건과 관계없이 일정한 농도의 선적 관계를 보여주었다 (Fig. 3-14 ~ 3-16). 다만 100 ug/mL 이상의 농도인 125~1,000 ug/mL에서 최대 radical scavenging activity를 보임과 동시에 더 이상의 라디칼 소거능의 증가는 보이지 않았다. 이는 녹차 잎의 결과와 유사한 pattern으로 보인다.

그러나 분말 녹차 추출물의 결과는 녹차 잎 추출물의 결과와 비교하였을 때 몇 가지 차이점을 보이고 있다. 우선 DPPH 라디칼 소거활성이 상대적 저 농도 처리군에서 나타난다는 것이다. 녹차 잎 추출물의 경우는, 저 농도인 15~62 ug/mL에서 10~50% 내외의 활성 증가를 보인 반면, 분말 녹차 추출물의 동일한 저 농도 처리군에서는 18~63%의 활성 증가율을 보였다. 또한 녹차 잎 추출물은 125 ug/mL 농도 처리군부터 최대 활성과 함께 활성의 threshold를 보인 반면, 분말 녹차의 경우는 100 ug/mL 농도 처리군부터 최대 활성과 라디칼 소거활성에 대한 threshold를 보여주었다. 결국 환원력의 측정에서와 유사하게 분말 녹차의 경우가 생리활성 물질의 추출효율이 상대적으로 우수하여 녹차 잎 추출물 대비 더 높은 항산화 능력으로서의 DPPH radical scavenging activity를 보인 것으로 사료된다.

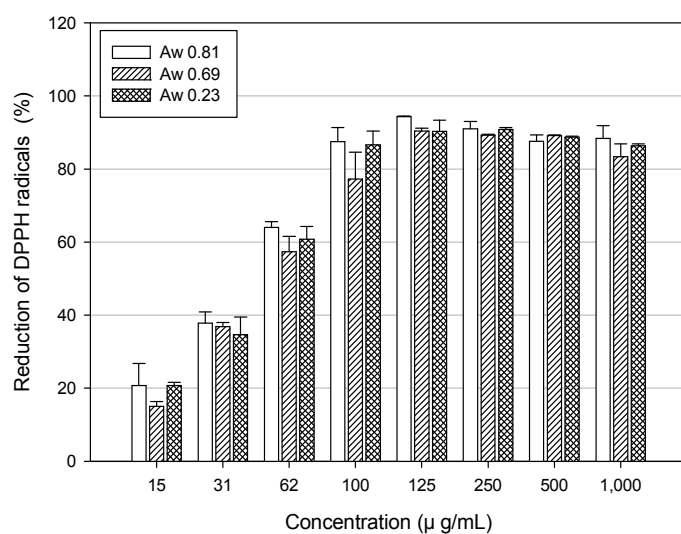


Fig. 3-14. DPPH radical scavenging activities of 70°C distilled water extracts from green tea powder. The DPPH radical scavenging activities was performed after 3 months storing at room temperature. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

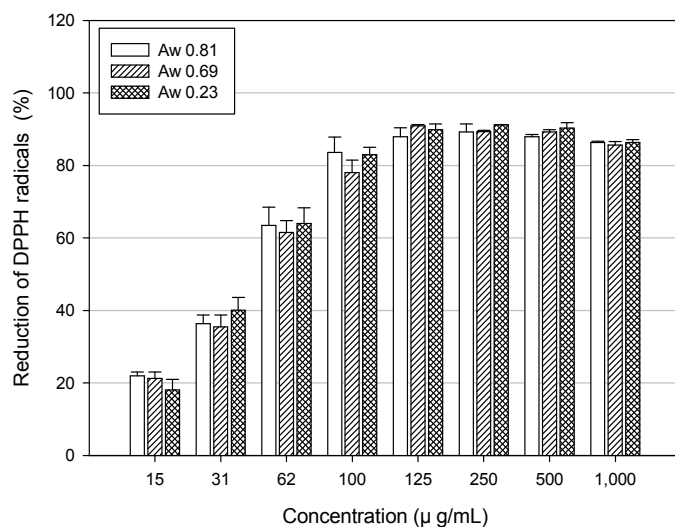


Fig. 3-15. DPPH radical scavenging activities of 70°C distilled water extracts from green tea powder. The DPPH radical scavenging activities was performed after 3 months storing at 4°C. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

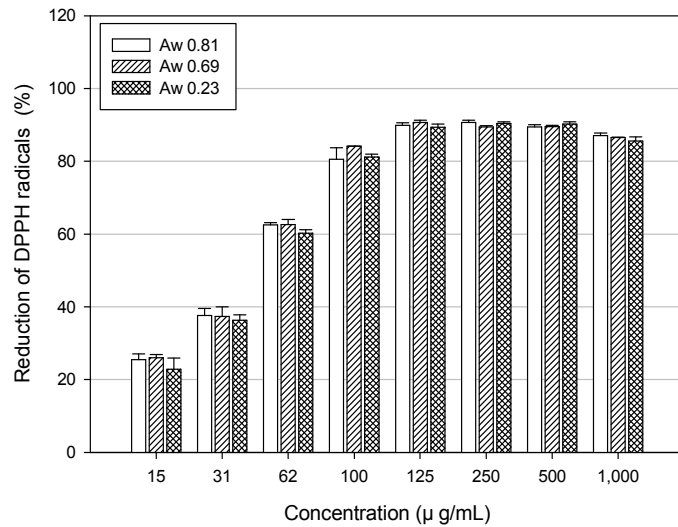


Fig. 3-16. DPPH radical scavenging activities of 70°C distilled water extracts from green tea powder. The DPPH radical scavenging activities was performed after 3 months storing at -20°C. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

(3) FRAP 측정

(가) 잎 녹차의 FRAP 측정

FRAP (Ferric reducing/antioxidant power) assay는 비교적 최근에 개발된 ‘총 항산화능 측정법’으로 낮은 pH에서 환원제에 의해 ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ)으로 환원되는 원리를 이용한 것으로 대부분의 항산화제가 환원력을 가지고 있다는 점에 착안하여 고안되어진 방법이다. 녹차 잎의 열수 추출물 (70°C distilled water)을 이용하여 FRAP assay에 의한 항산화 활성을 측정한 결과는 다음 (Fig. 3-17 ~ 3-19)과 같다. 결과의 흡광도 값을 측정하여 항산화 능력을 판단하는 환원력 결과와 유사하게, 녹차 잎 열수 추출물의 농도가 증가함에 따라 FRAP법에 의한 항산화 결과도 점진적인 농도 의존성을 보여주었다. 특히 최대 처리 농도군인 1,000 ug/mL에서 최대 항산화활성을 보여주었고, 이 결과는 저장온도와 수분활성도에 의한 차이는 크지 않은 것으로 보인다. 다만 FRAP assay에서는 상온에서 냉동조건인 저장 온도가 낮아질수록 500 ug/mL 이상의 처

리 농도에서 그 증가폭이 크게 나타남을 볼 수 있었고, 그 결과로 -20°C 의 냉동 저장조건에서의 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 처리군의 항산화력이 가장 높게 나타났다. 또한 수분활성도 측면에서도 미묘한 차이가 발생하였는데, 500 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도 처리군에서 수분활성도가 0.81 이하의 조건인 0.69와 0.23의 추출물에서 상대적으로 우수한 항산화 능력이 나타났다.

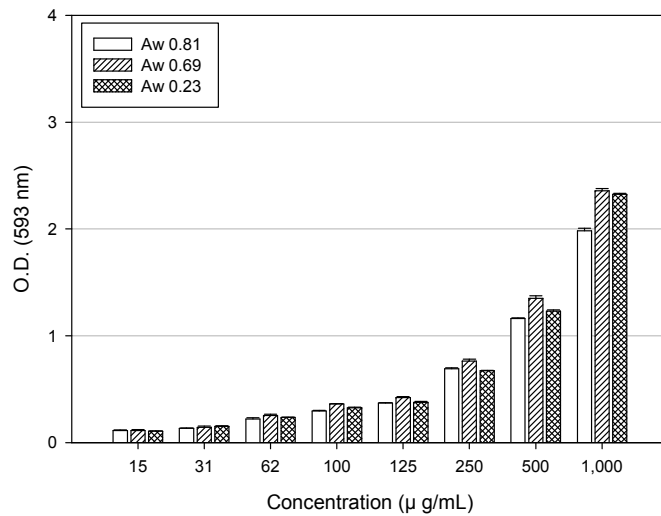


Fig. 3-17. FRAP (Ferric reducing/antioxidant power) assay of 70°C distilled water extracts from green tea leaves. The FRAP assay was performed after 3 months storing at room temperature. Values represent the means ($n = 3$) \pm S.D.

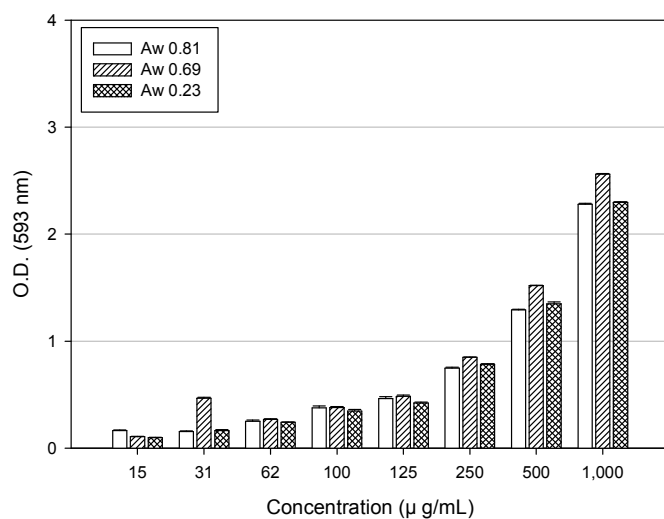


Fig. 3-18. FRAP (Ferric reducing/antioxidant power) assay of 70°C distilled water extracts from green tea leaves. The FRAP assay was performed after 3 months storing at 4°C. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

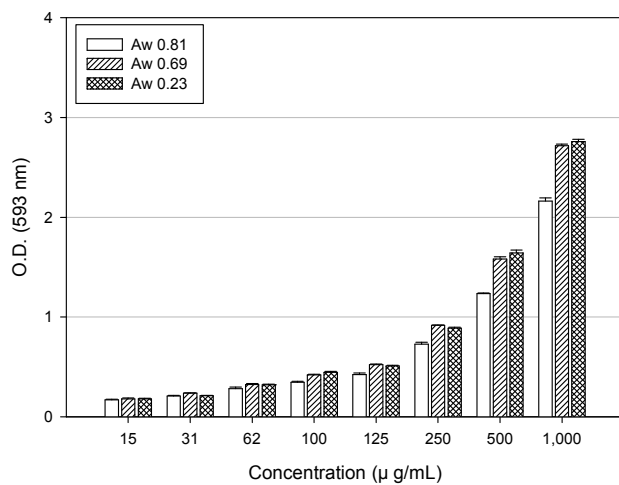


Fig. 3-19. FRAP (Ferric reducing/antioxidant power) assay of 70°C distilled water extracts from green tea leaves. The FRAP assay was performed after 3 months storing at -20°C. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

(나) 분말 녹차의 FRAP 측정

분말 녹차의 열수 추출물도 동일한 조건에서 FRAP assay를 측정하여 그 결과를 다음과 같이 나타냈다 (Fig. 3-20 ~ 3-22). 녹차 잎의 추출물과 유사하게 15 ug/mL에서 1,000 ug/mL의 처리군 까지 농도의존적인 항산화 활성도를 보여주었고, 역시 500 ug/mL 이상의 농도에서 극적인 항산화 활성의 증가를 나타냈다.

다만 녹차 잎의 열수 추출물 결과에 비해 다소간의 차이가 발생하였다. 우선 FRAP assay에 의한 항산화 활성이 녹차 잎 추출보다 상대적으로 높게 나타났다. 녹차 잎 추출물의 경우는 500 ug/mL 이상의 농도 처리군 에서의 항산화 활성이 냉동저장 조건에서 가장 높게 (흡광도 1.6~2.7 정도) 나타났지만, 분말 녹차의 경우 상온, 냉장, 그리고 냉동 저장조건에 관계없이 모두 높게 (흡광도 1.8~2.9 내외) 나타났다. 또한 녹차 잎 추출에서의 수분활성도의 결과와는 다르게 분말 녹차 추출물의 경우는 수분활성도 차이와의 관계가 거의 없는 것으로 판단된다.

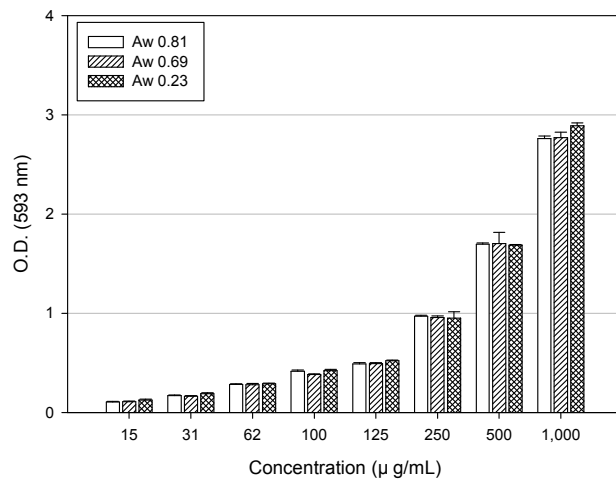


Fig. 3-20. FRAP (Ferric reducing/antioxidant power) assay of 70°C distilled water extracts from green tea powder. The FRAP assay was performed after 3 months storing at room temperature. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

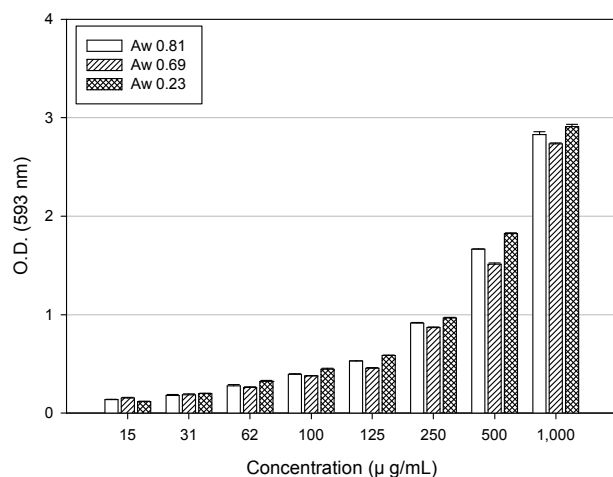


Fig. 3-21. FRAP (Ferric reducing/antioxidant power) assay of 70°C distilled water extracts from green tea powder. The FRAP assay was performed after 3 months storing at 4°C. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

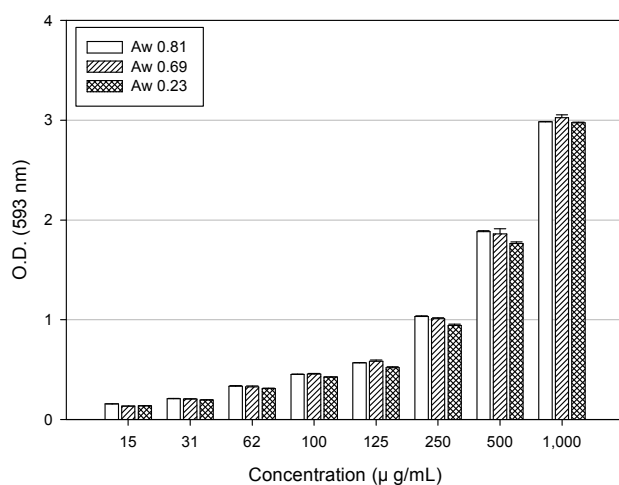


Fig. 3-22. FRAP (Ferric reducing/antioxidant power) assay of 70°C distilled water extracts from green tea powder. The FRAP assay was performed after 3 months storing at -20°C. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

항산화 연구를 요약하면, 3개월 저장하는 동안 저장온도와 수분활성의 차이를 두어 환원력, DPPH radical scavenging activity, 그리고 FRAP assay의 항산화 활성 정도를 측정한 결과는 다음과 같이 요약할 수 있다. 3개월 정도의 저장조건에서는 저장 온도 및 수분활성도의 차이가 항산화 활성정도에는 크게 기여하지 못하는 것으로 판단된다. 다만 생리활성물질을 보다 효율적으로 추출할 수 있는 녹차의 상태가 더욱 중요하고 그 상태는 잎 보다는 분말의 상태가 더 우수한 것으로 판단된다. 더불어 녹차의 주요 생리활성 성분은 catechins으로 알려지고 있으며, 6종류의 catechin isoforms 중에서 EGCG (epigallocatechin gallate) 성분이 약 65%를 차지하는 것으로 알려지고 있다. 또한 녹차 catechins 중에서 EGCG의 항산화력이 ECG (epicatechin gallate) 다음의 두 번째인 것으로 보고되고 있으므로 해당 환원력의 증가는 EGCG에 의한 항산화 효과로 판단될 수 있다. 물론 3가지 항산화 실험 간에 보이는 미묘한 차이를 밝히기 위해서는 정확한 반응 mechanism을 살필 필요가 있다. 이를 위해서는 추출물에 포함된 생리활성성분의 동정과 저장 조건에서의 그 구조적 변화와의 관계를 살피는 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

라. 뇌신경전달물질 (acetylcholine) 분해효소 (acetylcholinesterase)에 대한 저해효과 측정

(1) 잎 녹차 추출물의 acetylcholinesterase에 대한 저해효과

녹차 잎을 저장조건 별 (수분활성도: 0.83, 0.69, and 0.23; 저장기간: fresh~4 weeks)로 분리하여 acetylcholinesterase inhibitory (AChEi) effect를 측정하였다. 측정을 위해 각 sample의 열수 추출물 (70°C distilled water)의 농도는 100, 500, and 1,000 ug/mL로 구분하여 농도별 효소저해 효과를 살펴보았다 (Fig. 3-23 ~ 3-25). Acetylcholinesterase에 대한 효소 저해 측정을 위해 positive control로서 BW284c51 0.1 mM을 활용하였으며, 그 저해효과를 80~90% 정도로 유지할 수 있는 반응시간으로 10분을 설정하였다. Positive control로서의 BW284c51의 AChEi activity는 약 84% 정도였으며, 이에 비해 녹차 잎 추출물 중 100, 500 ug/mL의 처리군은 fresh sample의 열수 추출물을 제외하고는 모두 AChEi 저해 활성이 거의 없음을 나타냈다. 단 fresh sample의 경우가 100 ug/mL과 500 ug/mL에서 각각 5%, 25%의 AChEi activity를 나타냈다. 그러나 각 sample에 대한 열수 추출물의 처리 농도가 1,000 ug/mL에

서는 전체적으로 AChEi activity가 3~42% 정도로 상대적으로 높게 발생되었다. 특히 fresh sample의 경우가 가장 높은 42%의 효소 저해활성도를 보여주었고, 나머지 저장기간별 sample의 추출물은 대부분 10% 내외의 효소저해 활성을 나타냈다. 결국 4주까지의 저장조건에서 녹차 잎 열수 추출물의 AChEi 효과는 fresh sample에서 농도 의존적인 pattern을 보였으며 (5~42%), 나머지 저장조건 (저장기간 및 수분활성도)별 처리군에서는 1,000 ug/mL를 제외하고는 별다른 효소저해 활성도를 발견할 수 없었다.

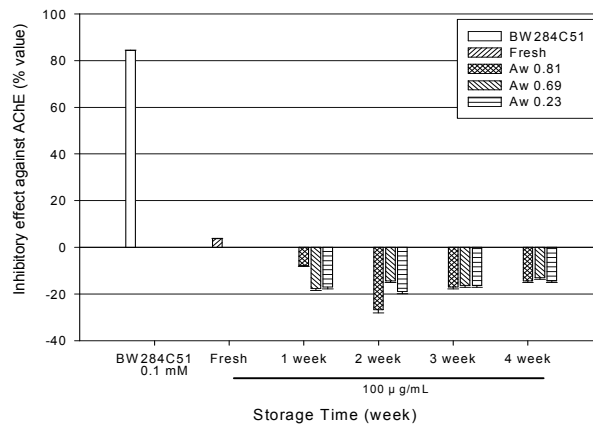


Fig. 3-23. Inhibitory effect on AChE activities of green tea leaves extracted by using 70°C distilled water. The enzyme activity was calculated as compared to the control activity (100%). Sample concentration was 100 ug/mL. Values represent the means (n = 3) ± S.D. BW 284c51 [1,5-bis (4-allyldimethylammoniumphenyl)-pentane-3-one dibromide]: the specific AChE inhibitor. Concentration was 0.1 mM.

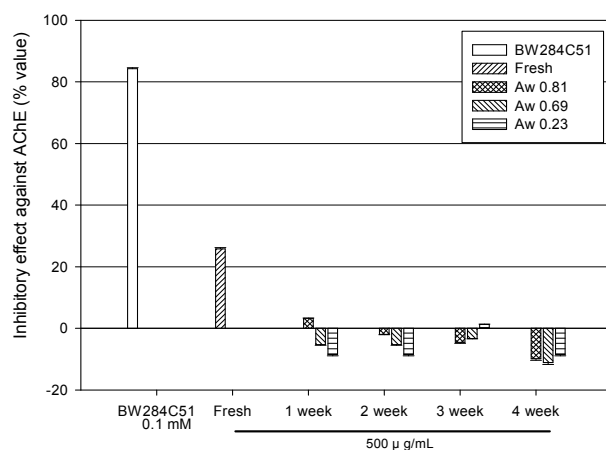


Fig. 3-24. Inhibitory effect on AChE activities of green tea leaves extracted by using 70°C distilled water. The enzyme activity was calculated as compared to the control activity (100%). Sample concentration was 500 µg/mL. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

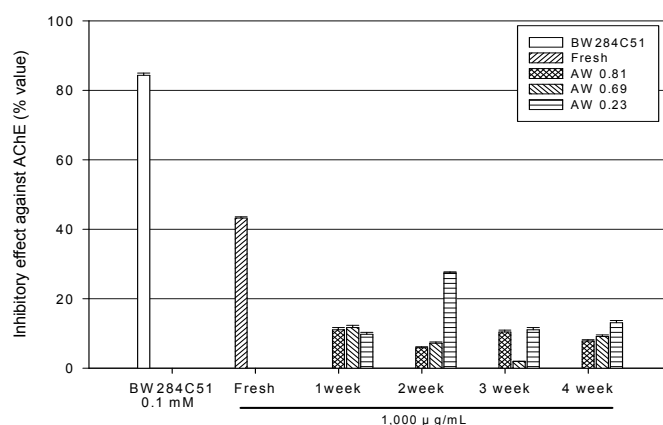


Fig. 3-25. Inhibitory effect on AChE activities of green tea leaves extracted by using 70°C distilled water. The enzyme activity was calculated as compared to the control activity (100%). Sample concentration was 1,000 µg/mL. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

녹차 잎은 또한 3개월간 저장하면서 그 저장조건으로 수분활성도 (0.81, 0.69, and 0.23)와 함께 저장온도 (상온, 4°C, and -20°C)조건을 추가로 구성하여 AChEi activity를 측정하였고 그 결과는 다음과 같다 (Fig. 3-26 ~ 3-28). 저장온도 조건별 모든 실험에서 positive control인 BW284c51 0.1 mM 처리군은 효소저해 활성 (AChEi activity)이 약 89% 정도였고, 100 ug/mL와 500 ug/mL 처리군은 통계적인 유의차를 고려할 때 20% 내외의 AChEi activity를 보였다. 녹차 잎 열수 추출물 1,000 ug/mL 처리군은 역시 상대적으로 우수한 AChEi activity를 나타냈다. 그러나 3개월간 저장한 sample 추출물에 대한 결과는 4주간 저장한 sample의 추출물과는 다소 상이한 결과를 보여주었는데, 각 수분활성도 조건에서 농도 의존적인 효소저해 활성을 모든 저장온도 조건에서 보여주었다. 더불어 통계적인 유의성을 고려했을 때, 냉동조건 (-20°C)을 제외하고는 수분활성도 0.81과 0.23의 열수 추출물이 수분활성도 0.69보다 높은 효소저해 활성도를 나타냈고 수분활성도 0.81과 0.23에 의한 효소저해 활성도 차이는 거의 없는 것으로 판단된다.

요약하면, 4주까지의 저장조건에서 녹차 잎의 조건별 열수 추출물의 AChEi activity는 fresh 조건의 추출물이 가장 우수하였으며 특히 1,000 ug/mL의 고농도에서 최대 효소저해 활성 (42%)이 나타났다 (Fig. 3-24). 3개월까지의 저장조건에서는 수분활성도별 농도 의존적인 효소저해 활성을 볼 수 있었고, 역시 가장 처리 농도가 높은 1,000 ug/mL의 경우가 최대 효소저해 활성 (AChEi activity)을 나타내고 있었다. 다만 3개월 저장조건의 100 그리고 500 ug/mL 농도 처리군에서 20% 내외의 AChEi effect가 나타난 것과, 수분활성도 0.81과 0.23의 녹차 잎 열수 추출물의 상대적으로 높은 효소저해 활성도의 발생 원인은 생리활성 성분에 대한 구체적인 characterization 연구가 지속되어야 하는 필요성을 남기는 것으로 사료된다.

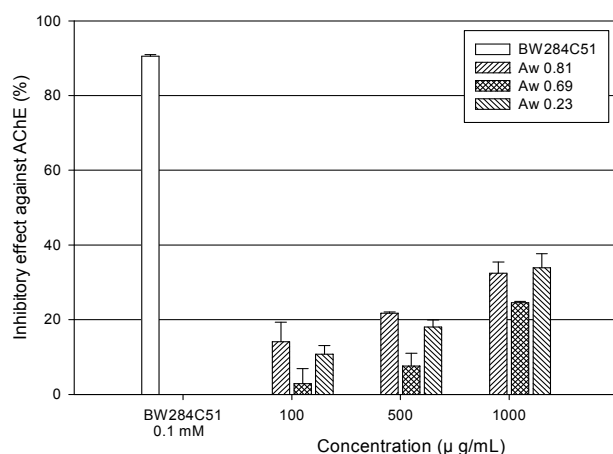


Fig. 3-26. Inhibitory effect on AChE activities of green tea leaves extracted by using 70°C distilled water. The enzyme activity was calculated as compared to the control activity (100%). Enzymatic assay was performed after 3 months storing at room temperature. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

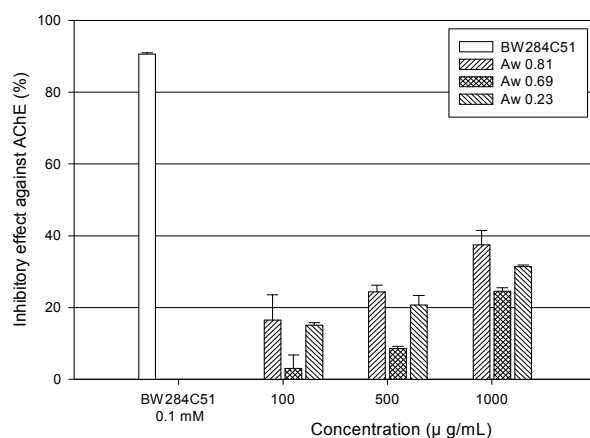


Fig. 3-27. Inhibitory effect on AChE activities of green tea leaves extracted by using 70°C distilled water. The enzyme activity was calculated as compared to the control activity (100%). Enzymatic assay was performed after 3 months storing at 4°C. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

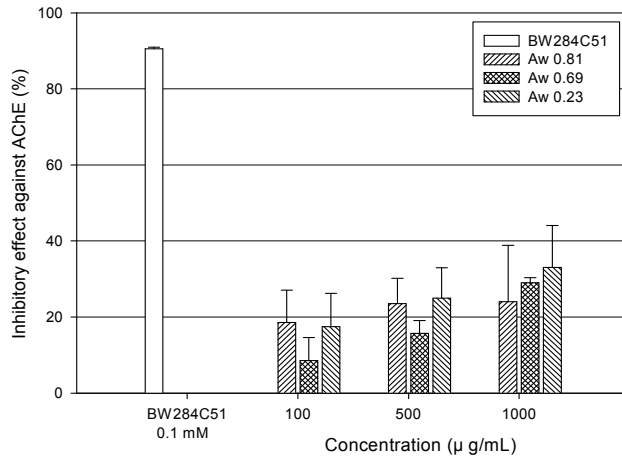


Fig. 3-28. Inhibitory effect on AChE activities of green tea leaves extracted by using 70°C distilled water. The enzyme activity was calculated as compared to the control activity (100%). Enzymatic assay was performed after 3 months storing at -20°C. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

(2) 분말 녹차 추출물의 acetylcholinesterase에 대한 저해효과

분말 녹차의 열수 추출물 (70°C distilled water) 또한 녹차 잎의 실험 조건과 동일하게 준비하여 AChEi effect (acetylcholinesterase 저해효과) 를 측정하였다 (Fig. 3-29 ~ 3-31). 각각의 수분활성도 (0.81, 0.69, and 0.23)를 갖는 fresh 분말 녹차부터 4주간 저장한 분말 녹차를 100, 500, and 1,000 µg/mL 농도를 준비하였고, positive control로서 BW284c51 0.1 mM를 활용하였다. 녹차 잎의 경우와 동일하게, positive control의 효소저해 활성도 (AChEi activity)는 80~90%를 유도할 수 있도록 반응시간을 10 min 유지하였다. 분말 녹차의 100 µg/mL 농도 처리 군에서는 fresh한 sample의 열수 추출물의 효소저해 활성도는 관찰되지 못했고, 1~4주 저장한 추출물에서 20~25%의 효소저해활성도를 보였다. 이때 수분활성도의 영향은 매우 미비한 것으로 판단되어 그 차이는 무시할 수 있는 수준으로 사료된다. (Fig. 3-29). Figure 3-29에서 볼 수 있는 분말 녹차 500 µg/mL 농도 처리 군에서는 fresh sample의 열수 추출물이 18%정도의 효

소저해 활성도를 나타냈고, 1~4주 저장한 분말 녹차의 열수 추출물은 약 27~39%의 AChEi activity를 나타냈다. 특히 100 ug/mL 처리군 대비 frsh sample의 열 추출물의 효소저해 활성도의 뚜렷한 증가가 관찰되었고, 1~4주 저장된 sample 추출물에서는 수분활성도 0.81를 갖는 분말 녹차의 열수 추출물이 약 38% 정도의 AChEi activity를 나타냈다. 분말 녹차 열수추출물의 농도가 1,000 ug/mL처리된 결과에서는 fresh sample의 효소저해 활성도가 36%로 더욱 증가되어 뚜렷한 농도 의존적인 AChEi activity를 보여주었다 (Fig. 3-30). 더불어 1~4주 저장된 분말 녹차 추출물의 경우에서도 효소저해 활성도의 증가 경향은 나타났지만, 특히 수분활성도 0.81을 갖는 sample의 열수 추출물의 두드러진 증가 pattern (40~47%)을 볼 수 있었다. 다만 녹차 잎의 열수 추출물의 경우, 단지 fresh sample에서만 농도 의존적인 pattern을 보였으며 (5~42%), 나머지 저장조건 (저장기간 및 수분활성도)별 처리군 에서는 1,000 ug/mL (20% 미만의 효소저해 활성도)를 제외하고는 별다른 효소저해 활성도를 발견할 수 없었다 (Fig. 3-25).

결국 녹차 잎과 분말 녹차 추출물의 결과에서 fresh sample의 AChEi activity는 유사하게 나타났으며, 저장기간 및 수분활성도의 저장 조건에 의한 차이에서도 분말 녹차 추출물의 효소저해 활성도가 상대적으로 우수하게 나타났다. 이는 역시 추출용매와 녹차 sample의 반응 표면적 차이에 의한 생리활성 성분의 추출 효율에서 기인되는 것으로 판단된다. 특히 녹차 잎 추출물의 경우는 두 가지 저장조건에 효소저해 활성도가 큰 영향을 받지 못한 것으로 나타났다. 그러나 분말 녹차에서는 fresh sample과 수분활성도 0.81을 갖는 sample이 상대적으로 더 우수한 AChEi activity를 보여주는 것으로 판단된다. 다만 4주간의 짧은 저장기간의 조건에서는 저장기간에 따른 효소저해 활성도의 차이는 발견되지 않았다.

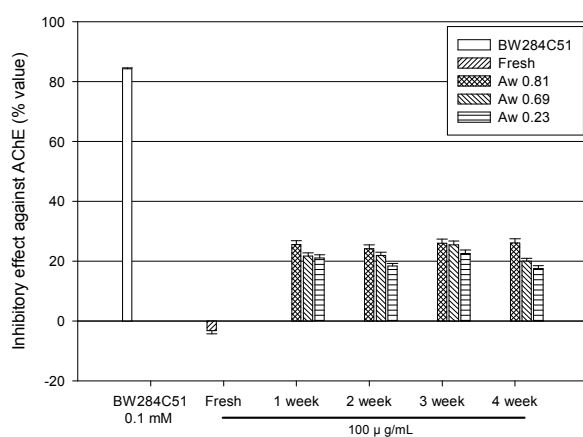


Fig. 3-29. Inhibitory effect on AChE activities of green tea powder extracted by using 70°C distilled water. The enzyme activity was calculated as compared to the control activity (100%). Sample concentration was 100 µg/mL. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

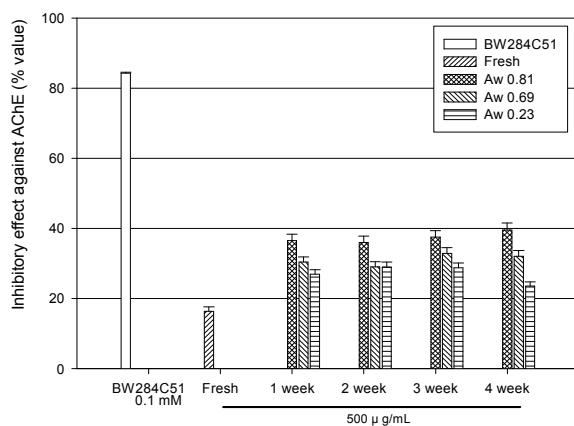


Fig. 3-30. Inhibitory effect on AChE activities of green tea powder extracted by using 70°C distilled water. The enzyme activity was calculated as compared to the control activity (100%). Sample concentration was 500 µg/mL. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

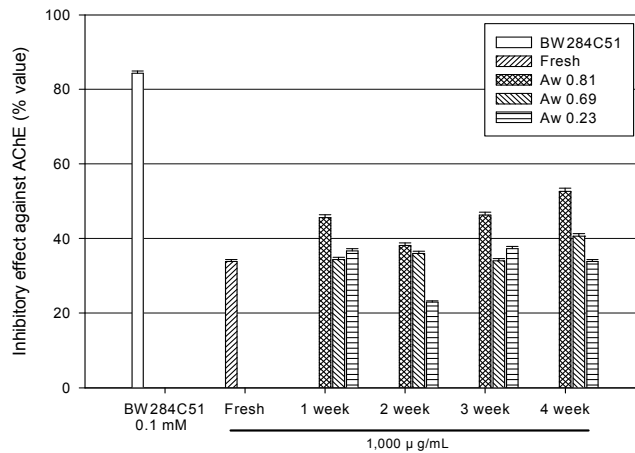


Fig. 3-31. Inhibitory effect on AChE activities of green tea powder extracted by using 70°C distilled water. The enzyme activity was calculated as compared to the control activity (100%). Sample concentration was 1,000 ug/mL. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

분말 녹차도 녹차 잎의 경우와 같이 3개월간 저장하면서 그 저장조건으로 수분활성도 (0.81, 0.69, and 0.23)와 함께 저장온도 (상온, 4°C, and -20°C)조건을 구성하였고, 이 조건을 바탕으로 AChEi activity (효소저해 활성도)를 측정하였다 (Fig. 3-32 ~ 3-34). 효소저해 활성도 측정을 위한 실험에서 BW284c51 (0.1 mM)이 positive control로 활용되었다. 상온에서 저장된 분말 녹차의 열수 추출물 (70°C distilled water)은 4주 저장한 sample의 결과와 유사하게 20%를 상회하는 효소저해 활성도를 나타냈다 (Fig. 3-31). 또한 농도별 효소저해 활성증가와 수분활성도 0.81과 0.23 추출물의 우수한 AChEi activity가 있는 것으로 관찰되지만, 이는 통계적인 유의성을 고려할 때 두 조건 (처리 농도 및 수분활성도)에 있어서의 차이는 큰 의미가 없는 것으로 판단된다. 냉장조건인 4°C 분말녹차의 열수 추출물도 농도가 1,000 ug/mL로 증가할수록 효소저해 활성도가 증가하는 것으로 보이지만 이 결과 역시, 통계적인 유의성을 고려할 때, Fig. 3-31 결과와 유사한 25% 내외의 효소저해 활성도를 나타내는 것으로 판단된다. 의미가 크지 못한 것으로 판단된다 (Fig. 3-33). Figure 3-34은 냉동

저장조건 (-20°C)의 결과를 보여주는데, 100 ug/mL와 500 ug/mL 처리군의 효소저해 활성도는 크게 증가됨이 없는 것으로 나타났다. 다만 분말 녹차 열수 추출물 1,000 ug/mL 처리군의 결과는 상온 및 냉장 저장 조건의 결과에 비해 상대적으로 크게 AChE activity (47%)가 증가하는 경향을 보여주었다.

결국 3개월 저장 후 측정된 분말 녹차의 AChE activity는 저장 온도에 따른 차이는 크지 않은 것으로 판단되지만, 수분활성도의 차이는 수분활성도 0.81의 효소저해 활성도가 상대적으로 우수함을 알 수 있다. 특히 수분활성도 0.23의 열수 추출물이 4주 저장한 sample 추출에 비해 효소활성 저해도가 크게 향상된 것으로 사료되지만 이를 확인하기 위해서는 저장조건별 생리활성 물질의 구조변화 등의 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다. 또한 같은 조건의 녹차 잎 추출물에 비해 acetylcholinesterase 효소저해 활성도는 분말 녹차의 것이 우수한 것으로 보인다.

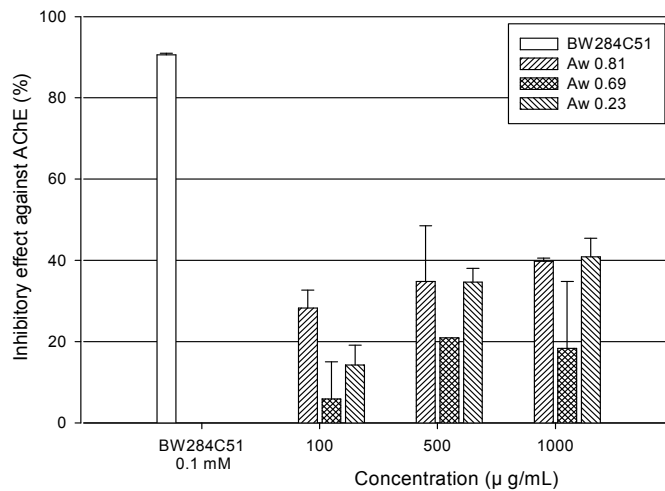


Fig. 3-32. Inhibitory effect on AChE activities of green tea powder extracted by using 70°C distilled water. The enzyme activity was calculated as compared to the control activity (100%). Enzymatic assay was performed after 3 months storing at room temperature. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

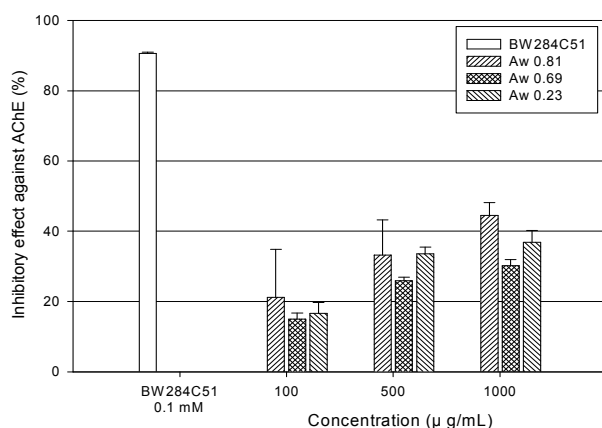


Fig. 3-33. Inhibitory effect on AChE activities of green tea powder extracted by using 70°C distilled water. The enzyme activity was calculated as compared to the control activity (100%). Enzymatic assay was performed after 3 months storing at 4°C. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

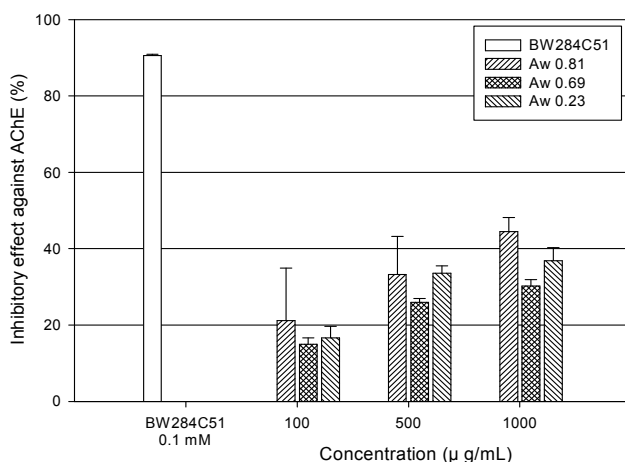


Fig. 3-34. Inhibitory effect on AChE activities of green tea powder extracted by using 70°C distilled water. The enzyme activity was calculated as compared to the control activity (100%). Enzymatic assay was performed after 3 months storing at -20°C. Values represent the means (n = 3) ± S.D.

퇴행성 뇌신경질환으로서의 치매 개선효과를 유도할 수 있는 AChE (acetylcholinesterase)에 대한 효소저해 활성도를 기준으로 요약하면, 4주까지의 저장조건에서 녹차 잎의 조건별 열수 추출물의 AChEi activity는 fresh 조건의 추출물이 가장 우수하였으며 특히 1,000 ug/mL의 고농도에서 최대 효소 저해 활성 (42%)이 나타났다 (Fig. 3-35). 3개월까지의 저장조건에서는 수분활성도별 농도 의존적인 효소저해 활성을 볼 수 있었고, 역시 가장 처리 농도가 높은 1,000 ug/mL의 경우가 최대 효소저해 활성 (AChEi activity)을 나타내고 있었다. 다만 3개월 저장조건의 100 그리고 500 ug/mL 농도 처리군 에서 20% 내외의 AChEi effect가 나타난 것과, 수분활성도 0.81과 0.23 녹차 잎 열수 추출물의 상대적으로 높은 효소저해 활성도의 발생 원인은 생리활성 성분에 대한 구체적인 characterization 연구가 지속되어야하는 필요성을 남기는 것으로 사료된다.

또한 3개월 저장 후 측정된 분말 녹차의 AChEi activity는 저장 온도에 따른 차이는 크지 않은 것으로 판단되지만, 수분활성도의 차이는 수분활성도 0.81의 효소저해 활성도가 상대적으로 우수함을 알 수 있다. 특히 수분활성도 0.23의 열수 추출물이 4주 저장한 sample 추출에 비해 효소활성 저해도가 크게 향상된 것으로 사료되지만 이를 확인하기 위해서는 저장조건별 생리활성 물질의 구조변화 등의 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다. 또한 같은 조건의 녹차 잎 추출물에 비해 acetylcholinesterase 효소저해 활성도는 분말 녹차의 것이 우수한 것으로 보인다.

전체적으로 녹차 잎 추출물 보다는 분말 녹차 추출물의 경우가 그리고 저장된 sample보다는 fresh sample의 AChEi activity가 상대적으로 높았고 이는 생리활성 물질의 추출효율성과 생리활성 물질의 characterization 변화 측면에서 기인되는 것으로 판단된다. 또한 본 연구팀에서 구성한 저장 조건에서, 4주간의 짧은 저장기간이 3개월 저장조건 보다는 우수한 효소저해 활성도를 나타냈다. 수분활성도 측면에서는 수분활성도 0.81의 조건을 갖는 sample에서의 효과가 비교적 우수했고, 3개월 저장하는 동안의 저장 온도 조건은 효소저해 활성도에 큰 차이를 보이는 요소로 작용하지 못했다. 다만 상온이나 냉장조건 보다는 냉동상태의 저장조건이 다소 우수한 것으로 판단된다.

또한 3개월 저장조건을 기준으로 효소저해 활성 (AChEi)과 항산화 결과를 비교하면, 3개월의 저장조건에서는 저장 온도 및 수분활성도의 차이가 항산화 활성정도에는 크게 기여하지 못하는 것으로 판단된다. 결국 생리활성물질을 보다 효율적으로 추출할 수 있는 녹차의 상태와 처리 또는 섭취 농도가 더욱 중요한 것으로 사료되고, 추출 효율을 증가시키기 위해서는 잎 보다는 분말의 상태가 더 우수한 것으로 판단된다.

제 4 절 저장환경이 녹차제품의 생리활성 성분에 미치는 영향

1. 연구개발 수행 내용

가. 녹차 제조

각 녹차가공품의 분석을 위해 제조되는 녹차는 다음과 같은 방법으로 수행되었다. 즉, 녹차잎 시료 1 g을 100 mL의 증류수로 항온 수조(70°C)에서 5분간 추출하였으며, 제조된 각 녹차는 whatman No. 1 여과지로 여과하여 각각의 여과액을 분석에 사용하였으며, 한 시험구 당 3회 반복 실험을 실시하였다. 녹차 음료 저장 실험의 경우에는 각 녹차 추출물을 15 mL의 유리 용기에 12 mL씩 담아 4°C에서 저장하였다. 저장 조건에서 빛 차단군의 경우에는 유리 용기를 알루미늄 호일로 싸으며, 질소 치환군의 경우는 녹차 음료를 함유한 유리 용기를 질소 가스로 불어넣었고, 비타민 C 첨가군은 30 mg/100 mL 의 농도로 첨가하였다 (Table 1).

나. 총 페놀 함량

녹차에 존재하는 총 페놀 함량을 측정하기 위하여 각 녹차 시료 1 mL를 취하여 2%(w/v) Na_2CO_3 용액 1 mL를 가하고 3분간 방치한 후, 50% Folin-Ciocalteu 시약 0.2 mL를 가하여 반응시켜 30분간 상온에서 방치하였다. 이 혼합물을 10분간 $13,400\times g$ 에서 원심분리한 후, 상정액 1 mL를 취하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다(Gutfinger, 1981). 총 페놀 함량은 gallic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로 mg/g 단위로 나타내었다 (Fig. 4-1).

다. 총 플라바놀 함량

총 플라바놀 함량의 경우에는 각 녹차 시료 1 mL를 취하여 2.0% vanillin (8.0% methanolic HCl) 용액 5.0 mL를 가하여 20분간 상온에서 반응시킨 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다(Price et al., 1978). (+)-카테킨을 표준물질로 하여 검량곡선을 작성하여 총 플라바놀 함량을 계산하였다 (Fig. 4-2).

라. 아스코르브산 함량

아스코르브산 함량 분석을 위하여 녹차 시료 1 mL를 10분간 10,000×g에서 원심분리한 후 상정액 0.5 mL를 취하여 trichloroacetic acid (5%)용액 2 mL와 혼합하고 10분간 15,000×g에서 원심분리하였다. 상정액 1 mL에 0.1 mL의 85% orthophosphoric acid, 0.1 mL의 8% a,a-dipyridyl chloride, 그리고 0.1 mL의 3% aqueous ferric chloride 0.1 mL와 혼합하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다(Sikic et al., 1977). 아스코르브산 함량은 L-아스코르브산을 이용하여 작성한 표준곡선으로 L-아스코르브산으로 환산하여 mg/g 단위로 나타내었다 (Fig. 4-3).

마. 카테킨류 분석

카테킨류의 분석에는 HPLC(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하였으며, 이는 CTO 10AVP column oven, LC-6AD pump, SIL-10ADVP auto sample injector 그리고 SPD-10AVP UV/VIS detector로 구성되었으며, 210 nm에서 흡광도를 측정하였다(Wang et al., 2003; Lee et al., 2006). 칼럼은 Shim-pack CLC guard column (10×4 mm)이 결합된 Shimadzu Shim-VP ODS column 5 μm (250×4.6 mm)을 사용하였으며, 칼럼 온도는 40°C로 고정하였다. 이동상의 용매는 A는 0.1% orthophosphoric acid(v/v, in H₂O)이며, B는 0.1% orthophosphoric acid(v/v, in methanol)를 사용하였다. 이동상의 유속은 1.0 mL/min이었고, 용매 구배는 0~5분 B용매 40%, 5~12분 B용매 40~50%, 12~27분 B용매 50%로 유지, 27~30분 B용매 50~20%, 그리고 30~35분 B용매 20~0%로 하였다 (Fig. 4-4)

바. 색도 측정

녹차의 색도는 색차계 (Spectrometer CM-3500d, Minolta Co., Ltd. Osaka, Japan)를 이용하여 측정하였다. Hunter color *L*(lightness), *a*(redness), *b*(yellowness) 값을 3회 반복 측정하여 통계 처리하였다.

사. 라디칼 소거능 측정

녹차 시료 0.1 mL에 0.041 mM DPPH시약을 0.9 mL 첨가한 뒤 10분 동안 반응 시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하고, 다음의 식에 의해 라디칼 소거능을 구하였다(Blois, 1958).

$$\% \text{ DPPH radical scavenging activity} = \left[\frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

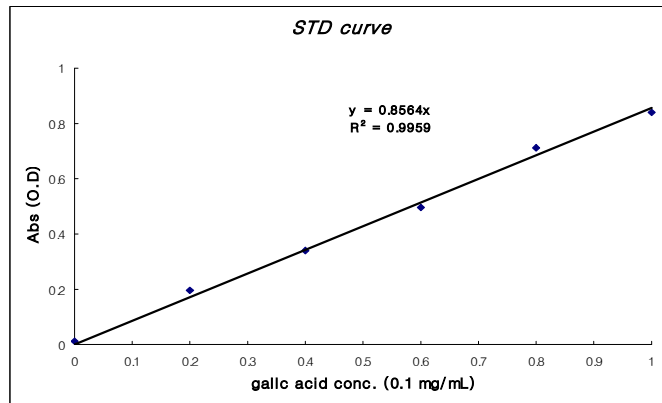


Fig. 4-1. Standard curve for total phenolic content.

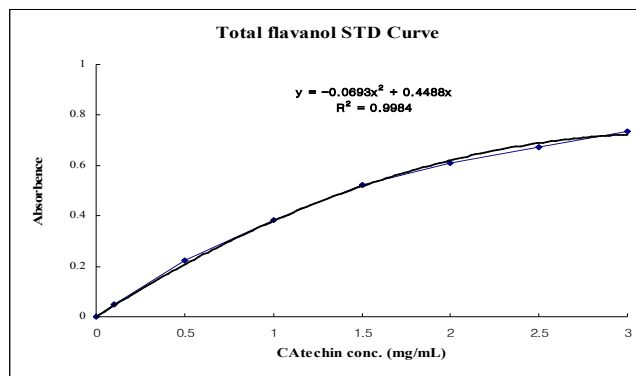


Fig. 4-2. Standard curve for total flavanol content.

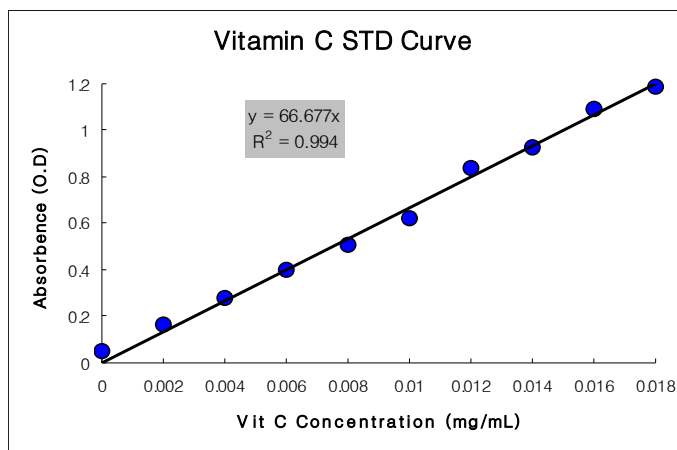


Fig. 4-3. Standard curve for ascorbic acid.

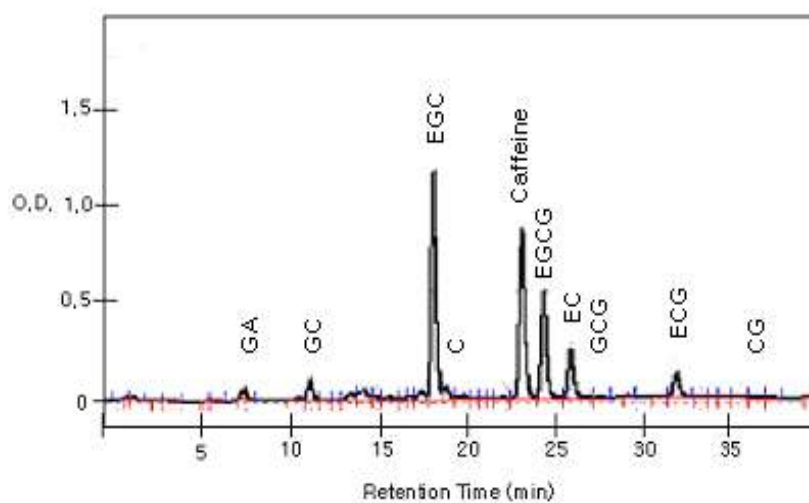


Fig. 4-4. HPLC chromatogram for catechin standard compounds.

아. 통계처리

데이터의 통계처리는 각 시료를 3회 반복으로 행해졌으며, SAS(Statistical Analysis System)를 이용하여 평균과 표준오차, Newman-Keul's multiple range tests로 평균값들에 대해 유의성을 검정하였다 (SAS, 1995).

2. 연구개발 수행 결과

차는 차나무과의 목본성 상록과인 차나무의 잎을 채취하여 가공한 것을 말하며, 세계에서 많이 소비되고 있는 기호식품 중 가장 오래된 것 중의 하나이다. 녹차는 차 잎을 높은 열에서 덫거나 수증기로 가열하여 차 잎에 함유된 카테킨 산화효소의 활성을 초기 단계에서 정지시킨 비발효차로서 우리나라에서 널리 음용되고 있다. 녹차는 항암, 항당뇨, 항고혈압 작용의 생리활성을 나타낸다(Ji et al., 1997). 차 잎은 75-80%의 수분과 20-25%의 고형물질로 구성되어 있는데, 고형 물질 속에 30여 가지의 성분이 함유되어 있어 차의 효능을 발휘한다. 이 고형물질에는 카테킨류, 카페인, 혼용 다당류, 비타민, γ -aminobutyric acid(GABA), 사포닌, 무기질, 테아닌 등의 유리 아미노산이 있다(Graham, 1992).

우리나라의 식품공전에서 녹차는 다류에 속하며, 다류는 식물성 원료를 주원료로 하여 제조·가공한 기호성 식품으로서 침출차, 액상차, 고형차를 말한다(Food Code 2008). 고형차는 식물성 원료를 주원료로 하여 가공한 것으로 분말 등 고형의 기호성 식품을 말하며, 물을 가하여 그대로 음용하거나 다른 식품에 첨가하는 소재로 이용될 수 있다. 분말 녹차는 고형차에 속하며, 녹차 잎을 건조 상태의 분말로 만든 것으로 물에 녹지 않는 카로틴, 섬유질, 비타민 A와 비타민 E 등을 섭취할 수 있는 장점이 있다.

한편, 건조식품은 수분활성도, 저장 온도 등의 다양한 요인들에 영향을 받는데 수분활성도에 따라 비효소적 갈변반응, 지방산패, 미생물 발생 정도가 달라진다. 녹차는 오랜 기간 저장하기 위해 건조하여 보관하므로 미생물에 의한 변질이 거의 없다. 그러나 흡습성이 강하여 상온에서 흡습하게 되면 급속하게 변질이 일어나게 된다. 특히 여름철은 고온 다습한 기후 때문에 변질이 일어나기 쉽기 때문에 차의 변질에 관계되는 요인을 고려하여 보관해야 된다. 차의 변질에 관여하는 주요 성분으로는 엽록소, 카테킨, 지질 및 카로티노이드, 비타민 C 등으로 이들 성분의 산화에 의해 색, 수색, 향미의 변화가 일어난다. 산화반응은 차잎 중의 수분 함량, 저장온도, 효소 및 광선 등의 영향을 받는다(Jeong et al., 1997; Park et al., 2005; Youn, 2004).

본 연구에서는 분말녹차의 저장 중에 습도와 온도가 품질에 미치는 영향

을 조사하기 위하여 상대습도를 3가지(23, 69, 81%)로 구분하여 일상생활에서 널리 이용되는 3가지 온도 (냉동, -20℃; 냉장, 4℃; 상온, 20℃) 조건에서 3달간 저장하면서 분말녹차의 품질변화에 대해서 조사하였다.

가. 잎녹차의 저장 환경이 생리활성에 미치는 영향

햇차원으로부터 현물 협조받은 덩음차잎을 상대습도 조건(23%, 69%, 81%)을 달리하여 상온에 저장하여 0, 3, 7, 14, 21, 28일의 저장 기간에 시료 1 g을 채취하여 70℃에서 물 100 mL을 첨가하여 5분간 추출하였다. 추출한 각 녹차 시료는 DPPH 라디칼 소거능, 환원력, 아질산 소거능을 분석하여 Table 4-1, 4-2, 4-3에 각각 나타내었다.

(1) 잎녹차의 저장 환경이 라디칼 소거능에 미치는 영향

Table 4-1에서 라디칼 소거능의 지표로 이용한 DPPH는 안정한 라디칼로써 환원되면 짙은 자색으로 탈색됨으로 항산화력인 수소 공여능을 측정하는데 이용되고 있다. 결과에 나타난 바와 같이 상대습도 0.23, 0.69 조건에서 저장 기간이 길어질수록 라디칼 소거능이 증가하여 0일째의 68.84%와 67.26%에 비하여 28일간의 저장 후에 각각 71.67%과 73.22%의 라디칼 소거능을 나타내었다. 그러나 0.81의 상대습도 조건에서는 14일째의 저장조건에서 0일째의 67.71%에 비하여 9% 이상이 증가한 76.79%로 측정되었다. 이는 상대습도와 저장 시일이 녹차의 주된 효능인 항산화능에 상당한 영향을 줄을 의미한다.

(2) 잎녹차의 저장 환경이 환원력에 미치는 영향

Table 4-2에는 잎녹차를 저장할 때 상대습도가 녹차의 환원력에 미치는 영향을 조사하여 그 결과를 나타내었다. 어떤 물질의 환원력은 그 물질의 항산화 능력의 중요한 지표가 된다. 모든 조건의 조사된 상대습도 조건에서 3일째의 저장기간에서 가장 환원력이 높았고, 그 이후에 감소하여 최종 저장일인 28일째에 가장 낮은 값을 보였다. 이러한 결과는 Table 4-1의 DPPH 라디칼 소거능과는 정확히 일치하지는 않는데, 이는 항산화 물질의 작용이 여러 기작 즉, 연쇄 반응 개시의 방해, 전이 금속물의 결합, 과산화물의 분해, 연속적 수소 제거의 방해, 라디칼 소거 등과 연관이 있으므로 측정 대상과 방법에 따라 차이가 나기 때문이다(Diplock, 1997).

Table 4-1. Effect of relative humidity (RH) on DPPH radical scavenging activity of green tea

		(%)					
RH	Storage Period (day)						
	0	3	7	14	21	28	
0.23	68.84 ^{cz}	67.06 ^{dy}	67.56 ^{dz}	69.09 ^{cy}	70.32 ^{by}	71.67^{az}	
0.69	67.26 ^{cz}	68.55 ^{cz}	67.56 ^{cz}	71.03 ^{by}	71.75 ^{bz}	73.22^{az}	
0.81	67.71 ^{cz}	67.43 ^{cy}	67.86 ^{cz}	76.79^{az}	71.52 ^{bz}	72.99 ^{bz}	

Table 4-2. Effect of relative humidity (RH) on reducing power of green tea

		(Optical Density)					
RH	Storage Period (day)						
	0	3	7	14	21	28	
0.23	1.47 ^{abz}	1.48^{ay}	1.28 ^{cz}	1.45 ^{abz}	1.41 ^{bz}	1.32 ^{cy}	
0.69	1.47 ^{bz}	1.52^{az}	1.30 ^{ez}	1.45 ^{bcz}	1.43 ^{cz}	1.34 ^{dz}	
0.81	1.48 ^{az}	1.50^{azy}	1.31 ^{cz}	1.44 ^{bz}	1.45 ^{bz}	1.33 ^{czy}	

(3) 잎녹차의 저장 환경이 아질산 소거능에 미치는 영향

Table 4-3에는 녹차의 아질산 소거능을 조사하여 나타내었다. 아질산 이온은 위의 산성 조건에서 세포손상과 돌연변이를 유발하며, 식품에 아질산이 많이 존재하면 위암과 결장암을 유발한다(Kato and Puck, 1971). pH 3.0의 조건에서 조사된 모든 상대습도의 조건에서 14일 이후의 저장 기간에는 95% 이상의 우수한 아질산 소거능을 나타내었다. pH 4.2의 조건에서도 14일 이후의 저장 기간에서 상대적으로 높은 아질산 소거능을 보였다. 그러나, pH 6.0의 조건에서는 매우 낮은 아질산 소거능을 보였다. pH에 따른 녹차의 아질산 소거능 변화는 다른 연구결과에서도 볼 수 있는 현상이었고, 본 연구에서는 저장 기간이 길어질수록 아질산 소거능이 증가한다는 결과를 얻을

수 있었다.

(4) 잎녹차의 저장 환경이 총 페놀 함량과 총 플라바놀 함량에 미치는 영향
페놀함량은 식물의 2차 대사산물의 주요물질로서, 수산기를 가지는 방향족 화합물을 총칭한다. 이는 수산기를 통한 수소공여와 페놀고리구조의 공명안정화에 의해 항산화능력을 나타낸다(Cespy and Williamson, 1994). 녹차에는 여러 종류의 폴리페놀 화합물을 함유하고 있는데 특히 플라바놀이 녹차의 주된 폴리페놀 화합물이다. Table 4-4에 각 조건의 녹차의 총 페놀 함량(TPC)과 총 플라바놀 함량(TFC)을 측정하여 나타내었다. 조사한 모든 상대습도 조건에서 녹차의 TPC는 3일째의 저장일에 가장 높았다. 그러나, TFC의 경우에는 0.23의 상대습도에서는 3일째에 가장 높았으나, 0.69와 0.81의 상대습도에서는 0일째가 가장 높았고 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과로부터 저장 기간 중에 상대 습도에 따라 녹차로부터 페놀 화합물이 생성 또는 분해되고 페놀 화합물 중 녹차의 유효 성분이라 할 수 있는 플라바놀도 전체적으로는 유사하지만 조금은 독특한 경향으로 생성, 분해되는 것을 알 수 있다.

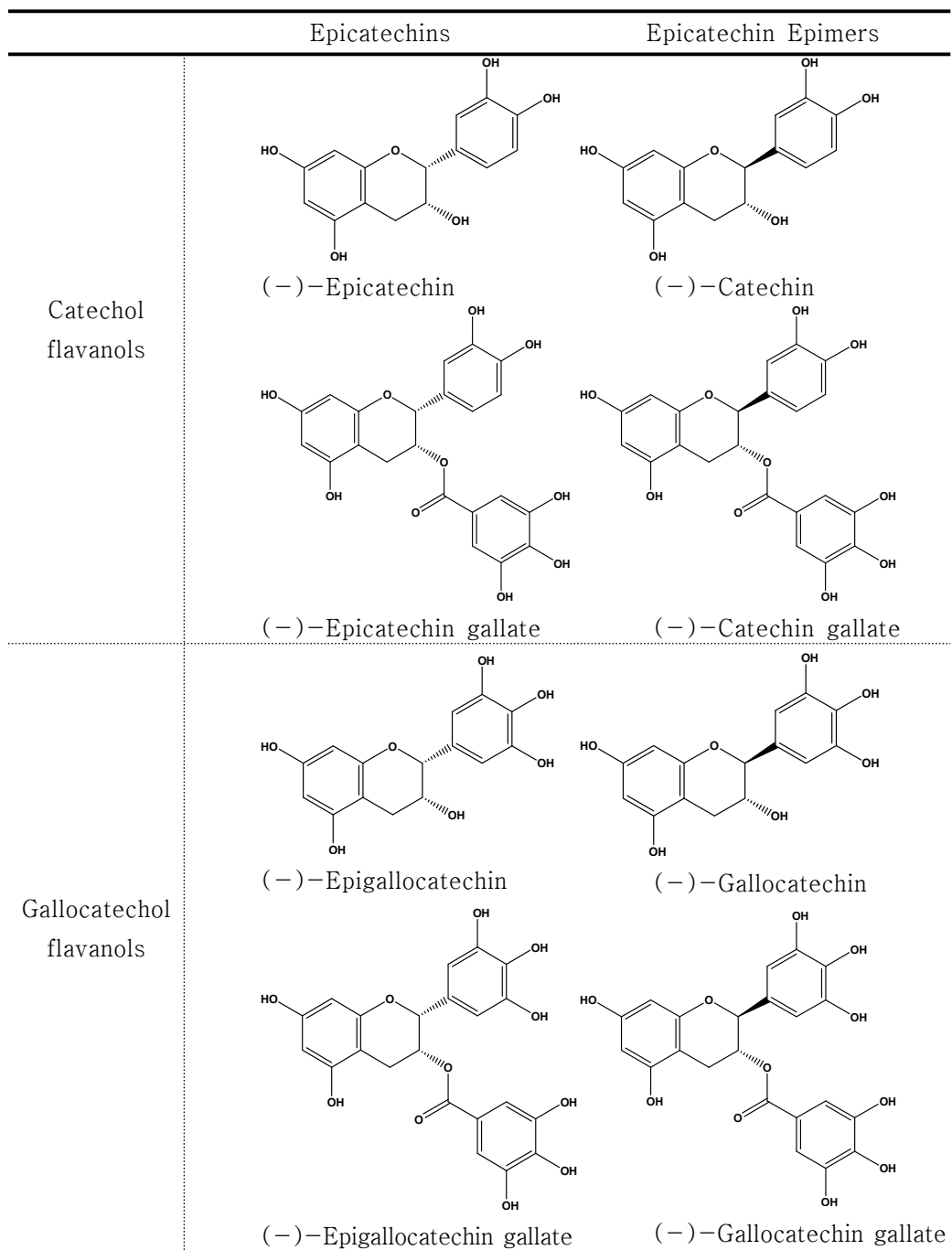
Table 4-3. Effect of relative humidity (RH) on nitrite scavenging activity of green tea

		(%)					
pH	RH	Storage Period (day)					
		0	3	7	14	21	28
3.0	0.23	92.10 ^{cy}	94.00 ^{bz}	91.80 ^{cz}	96.41 ^{az}	96.33 ^{az}	96.64^{az}
	0.69	93.97 ^{bz}	92.84 ^{cz}	91.38 ^{dz}	96.50 ^{az}	96.10 ^{azy}	96.55^{az}
	0.81	93.68 ^{cz}	93.85 ^{cz}	90.67 ^{dy}	95.68 ^{by}	95.87 ^{by}	96.43^{az}
4.2	0.23	17.33 ^{ez}	20.32 ^{dz}	14.42 ^{dz}	43.59 ^{cz}	45.48 ^{bz}	59.08^{az}
	0.69	18.65 ^{cz}	17.33 ^{cy}	11.64 ^{dz}	43.41 ^{bz}	42.36 ^{by}	53.43^{ay}
	0.81	17.93 ^{cz}	20.06 ^{cz}	13.06 ^{dz}	39.49 ^{by}	41.73 ^{by}	52.96^{ay}
6.0	0.23	0.79 ^{az}	0.23 ^{az}	-2.56 ^{az}	-1.15 ^{az}	-1.42 ^{az}	-2.44 ^{az}
	0.69	0.80 ^{az}	-0.64 ^{az}	-4.30 ^{az}	-1.35 ^{az}	-2.75 ^{az}	-1.32 ^{az}
	0.81	3.82 ^{az}	-0.35 ^{bz}	-3.16 ^{bz}	-0.76 ^{bz}	-1.74 ^{bz}	-0.98 ^{bz}

Table 4-4. Effect of relative humidity (RH) on total phenolic content (TPC) and total flavanol content (TFC) of green tea

		(mg/ml)					
	RH	Storage Period (day)					
		0	3	7	14	21	28
TPC	0.23	106.28 ^{ey}	149.38^{az}	112.64 ^{dz}	128.22 ^{cz}	131.86 ^{bz}	131.86 ^{bz}
	0.69	118.76 ^{cz}	132.02^{ax}	107.98 ^{ey}	127.13 ^{bz}	128.14 ^{by}	110.70 ^{dy}
	0.81	117.29 ^{cz}	136.12^{ay}	105.50 ^{ex}	105.27 ^{ey}	120.16 ^{bx}	107.79 ^{dx}
TFC	0.23	17.29 ^{ey}	22.77^{az}	18.14 ^{dz}	20.96 ^{cz}	21.99 ^{bz}	21.04 ^{cz}
	0.69	19.76^{az}	18.90 ^{by}	18.05 ^{bcz}	20.01 ^{ay}	18.14 ^{bcy}	17.63 ^{cy}
	0.81	19.93^{az}	19.50 ^{by}	18.31 ^{cz}	17.20 ^{dx}	18.05 ^{cy}	17.12 ^{dy}

Fig. 4-5. Structure of catechins of green tea.



(5) 잎녹차의 저장 환경이 카테킨류 함량에 미치는 영향

각 저장 조건에 따른 녹차의 카테킨류 함량을 HPLC로 분석하였다. Fig. 4-5에 표시한 녹차의 8가지 카테킨인 (+)-catechin (C), (-)-catechin gallate (CG), (-)-gallocatechin (GC), (-)-gallocatechin gallate (GCG), (-)-epicatechin (EC), (-)-epicatechin gallate (ECG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), 그리고 caffeine의 표준물질을 구입하여 각 저장 조건에서 함량을 산출하였다. Table 4-5, Table 4-6, Table 4-7에 각각 상대습도 0.23, 0.69, 그리고 0.81의 저장조건에서의 결과를 나타내었다. 모든 경우에서 주된 카테킨은 EGC와 EGCG였으며, 상대적으로 그들의 epimer인 GC와 GCG의 함량은 낮았다. 또한, EC와 ECG의 epimer인 C와 CG는 검출이 확인되지 않았다. Table 4-5에 나타난 바와 같이 상대습도 0.23에서는 유의차 검증 범위 내에서 저장 7일째와 21일째가 가장 높은 함량을 보였다. 카페인의 경우에는 측정된 모든 저장 기일에서 유의차가 없었지만 가장 높은 평균값은 7일째의 저장에서 발견되었다.

Table 4-6에는 상대습도 0.69의 조건에서 각 녹차의 카테킨류와 카페인의 함량을 나타내었다. 대체로 상대습도 0.23과 비슷한 경향을 나타내었으나, 14일째의 저장기일에서 가장 높은 ECG, EGCG, 카페인 함량이 검출되었다. 그러나 EGC와 EGCG, 카페인의 함량은 상대습도 0.21의 경우보다는 낮은 수치를 보여 습도가 높은 것이 녹차의 저장에 유리하지 않음을 알 수 있었다.

Table 4-7에는 상대습도 0.81의 조건에서 각 녹차의 카테킨류와 카페인의 함량을 나타내었다. 앞의 두 경우와 비슷한 경향이었고, 저장 기일 28일째에서 대체로 높은 값을 보였다. 이러한 결과는 상대습도 0.21에서 EGC, EGCG, 카페인의 최대값인 6.22, 8.42, 6.92 mg/ml과 비교할 때 각각의 최대값이 상대습도 0.81에서는 4.33, 5.54, 6.57 mg/ml이어서 습도가 낮은 것이 녹차의 잘 알려진 생리활성물질인 카테킨류의 생성 도는 유지에 긍정적임이 다시 확인되었다.

(6) 잎녹차의 저장 환경이 녹차의 색도에 미치는 영향

녹차의 색도는 녹차의 평가에 중요한 부분으로서 가호성에 관여한다. *L*(lightness), *a*(redness), *b*(yellowness)를 나타낸다. 상대습도 조건과 상관없이 저장 14일째 명도(*L*)가 높다가 낮아지는 경향을 보였다. 적색도인 *a*는 저장기간이 길어질수록 낮아지는 경향을 보였고, 황색도 *b*값은 상대습도 0.81 외에는 증가하다가 감소하는 경향을 보였다.

Table 4–5. Catechin components and caffeine of green tea at relative humidity (RH) 0.23

Storage Period (day)	(mg/ml)						
	GC	GCG	EC	ECG	EGC	EGCG	Caffeine
0	0.28 ^b	1.41^a	3.14^a	0.72^{ab}	4.74 ^{bc}	4.24 ^{bc}	6.07^a
3	0.32 ^b	1.04 ^b	2.46 ^{bc}	0.46 ^b	5.53^{ab}	5.82 ^b	6.30^a
7	0.30 ^b	0.62 ^{cd}	2.7^{ab}	0.97^a	5.49^{ab}	8.42^a	6.92^a
14	0.21 ^c	0.74 ^c	1.92 ^c	0.42 ^b	3.84 ^c	3.42 ^c	5.53^a
21	0.40^a	0.37 ^d	2.37 ^{bc}	0.85^a	6.22^a	7.76^a	6.36^a
28	0.31 ^b	0.26 ^d	2.27 ^{bc}	0.43 ^b	5.30^{ab}	5.20 ^{bc}	6.39^a

Table 4–6. Catechin components and caffeine of green tea at relative humidity (RH) 0.69

Storage Period (day)	(mg/ml)						
	GC	GCG	EC	ECG	EGC	EGCG	Caffeine
0	0.28 ^b	0.70^a	2.12^a	0.27 ^b	4.31^{ab}	3.82 ^b	5.85^a
3	0.28 ^b	0.29^a	1.78^a	0.28 ^b	4.54^{ab}	3.35 ^b	5.85^a
7	0.13 ^b	0.24^a	1.84^a	0.10 ^c	2.49 ^c	2.44 ^b	5.40^a
14	0.32 ^b	0.30^a	2.18^a	0.50^a	5.29^a	5.81^a	6.44^a
21	1.88^a	0.25^a	1.67^a	0.55^a	3.34 ^{bc}	5.35^a	5.30^a
28	0.16 ^b	0.57^a	1.90^a	0.20 ^b	3.07 ^{bc}	2.06 ^b	5.62^a

Table 4–7. Catechin components and caffeine of green tea at relative humidity (RH) 0.81

Storage Period (day)	(mg/ml)						
	GC	GCG	EC	ECG	EGC	EGCG	Caffeine
0	0.13 ^c	0.35 ^b	1.45 ^c	0.07 ^d	1.26 ^b	0.87 ^b	4.10 ^b
3	0.31^a	0.19 ^b	2.11 ^b	0.39 ^{bc}	4.04^a	3.52^a	6.57^a
7	0.22 ^b	0.23 ^b	1.92 ^{bc}	0.50^{ab}	4.03^a	4.38^a	5.72^a
14	0.22 ^b	1.18^{ab}	2.63^a	0.40^{bc}	3.65^a	4.29^a	5.81^a
21	0.25^{ab}	0.18 ^b	1.86 ^{bc}	0.36 ^c	3.67^a	3.80^a	5.93^a
28	0.27^{ab}	1.63^a	2.83^a	0.60^a	4.33^a	5.54^a	6.10^a

Table 4–8. Effect of relative humidity (RH) on color of green tea

	RH	Storage Period (day)					
		0	3	7	14	21	28
<i>L</i>	0.23	96.50^{az}	94.81 ^{by}	95.40^{aby}	96.05^{ay}	96.00^{ay}	96.32^{az}
	0.69	95.92 ^{bz}	95.70 ^{bz}	96.53 ^{bz}	98.74^{az}	95.57 ^{bz}	96.10 ^{bz}
	0.81	95.91 ^{bz}	95.95 ^{bz}	96.34 ^{bz}	98.41^{az}	96.21 ^{bz}	95.57 ^{bz}
<i>a</i>	0.23	-1.52^{az}	-2.02^{ay}	-2.06^{az}	-1.44^{az}	-1.53^{az}	-1.71^{ay}
	0.69	-1.82^{ez}	-1.73 ^{dy}	-1.52 ^{cz}	-1.40^{bz}	-1.43 ^{bz}	-1.35^{az}
	0.81	-1.72 ^{bz}	-1.37^{az}	-1.73 ^{bz}	-1.73 ^{bz}	-2.05 ^{cy}	-2.04 ^{cx}
<i>b</i>	0.23	10.02 ^{fy}	11.81 ^{bz}	10.84 ^{dz}	11.02 ^{cy}	12.36^{ay}	10.55^{ey}
	0.69	10.18 ^{cz}	10.45 ^{bx}	9.92 ^{dx}	10.93^{ay}	10.88^{ax}	9.87 ^{dx}
	0.81	9.82 ^{fx}	11.06 ^{dy}	10.54 ^{ey}	11.41 ^{cz}	12.62 ^{bz}	12.94^{az}

나. 분말녹차의 저장 환경이 생리활성에 미치는 영향

주관기관으로부터 지원받은 분말녹차를 상대습도 0.23, 0.69, 0.81 조건에서 저장온도 -20, 4, 20℃에서 0, 7, 14, 21, 28일째의 저장 기일에 녹차 1.5 g에 증류수 100 ml을 가하여 70℃에서 5분간 추출하였다. 추출한 각 녹차 시료의 총 페놀 함량, 총 플라바놀 함량과 아스코르빈산 함량을 측정하였다.

(1) 분말녹차의 저장 환경이 총 페놀 함량에 미치는 영향

Table 4-9에 분말녹차를 상대습도와 저장 온도를 달리하면서 저장하면서 저장 기일에 따라 측정한 녹차의 총 페놀 함량을 나타내었다. 한 경우를 제외하고는 대체로 21일째의 저장 기일에서 가장 높은 총페놀 함량이 검출되었다. 또한, 20℃의 상온에서 저장한 경우보다는 4℃ 또는 -20℃의 저온에서 보관하는 것이 훨씬 높은 총 페놀 함량을 나타내었다. 그리고 높은 상대 습도(0.81)보다는 낮은 상대습도(0.23과 0.69)에서 높은 총 페놀 함량을 보여 역시 상대습도가 녹차의 품질에 심각한 영향을 미침을 알 수 있었다. 가장 높은 총 페놀 함량은 4℃에서 상대습도 0.23의 조건에서 21일째 저장하였을 때 436.24 mg/g의 수치로 나타났다. Table 4-10에 3달간 저장한 후에 저장 습도와 온도에 따른 분말 녹차의 총 페놀 함량의 변화를 나타내었다. 모든 온도 조건에서 상대 습도가 가장 낮은 조건(23%)의 분말녹차에서 가장 높은 페놀 함량이 측정되었다. 가장 높은 총페놀 함량은 4℃, 상대습도 23% 조건에서 저장한 경우의 287.1 mg/g 이었으며 이는 저장 초기의 267.5 mg/g에 비하여 7.3% 증가한 수치이다. 상대습도 69%와 81%의 조건에서 -20℃에 저장한 경우에는 각각 210.6 mg/g과 211.8 mg/g 으로서 초기보다 20% 이상의 페놀 함량이 감소하였다.

(2) 분말녹차의 저장 환경이 총 프라바놀 함량에 미치는 영향

플라바놀은 폴리페놀의 한 종류로서 녹차에 존재하는 카테킨류가 이에 해당한다. Table 4-11에 나타난 녹차의 총 플라바놀 함량도 총 페놀 함량과 유사한 결과를 보였는데, 저장 온도와 관계없이 저장 기간 21일째에 대체로 높은 값이 측정되었다. 또한, 20℃의 상온에서 저장한 경우보다는 4℃ 또는 -20℃의 저온에서 보관하는 것이 플라바놀 함량에는 우수하였다. 가장 높은 총 플라바놀함량은 4℃에서 상대습도 0.69의 조건에서 21일째 저장하였을 때 64.44 mg/g이었다. Table 4-12에는 3달간 저장한 후에 저장 습도와 온도에 따른 분말 녹차의 총 플라바놀 함량의 변화를 나타내었다. 3달간의 저장 후

에는 Table 4-10의 총 페놀함량의 경우와 유사하게 모든 저장 온도 조건에서 상대 습도가 낮은 조건(23%)에서 높은 값을 보였다. 또한 3달 후의 경우, 상대습도 69%과 81%에서는 4℃에 저장한 경우가 -20℃와 20℃에 저장한 경우보다 높은 플라바놀이 검출되었고, 상대습도 23%에서는 4℃와 20℃에서 각각 44.9 mg/g과 45.5 mg/g으로 비교적 높은 값을 보였다. 그러나, 분말 녹차의 플라바놀 함량은 저장 기간이 경과함에 따라 모든 경우에서 저장 초기의 경우보다 낮은 값을 나타내었다.

이상의 결과는 저장 온도, 상대습도가 분말 녹차의 페놀 함량과 플라바놀 함량에 민감한 영향을 미침을 의미한다. 또, 총 페놀 함량은 일부 저장 조건에서 증가하였는데, 이는 녹차가 분말로 가공된 후에도 저장된 상태에서 여러 변화가 일어남을 시사한다. 이러한 변화에는 외부 환경 요인에 따른 변화도 있지만, 내부의 요인에 따른 변화도 있으며 이들의 상충 작용에 의해 페놀 함량은 증가하였다. 그러나, 플라바놀 함량은 모든 경우에서 감소하여 페놀 화합물이 종류에 따라 다른 변화 양상을 보임을 알 수 있다.

(3) 분말녹차의 저장 환경이 아스코르브산 함량에 미치는 영향

Table 4-13에 나타낸 녹차의 아스코르빈산 함량도 위의 두 경우와 유사하여 저장 온도와 관계없이 저장 기간 21일째에 대체로 높은 값이 측정되었다. 상대습도와 저장 온도는 뚜렷한 경향을 보이지는 않았으며, 가장 높은 아스코르브산 함량은 -20℃에서 상대습도 0.69의 조건에서 21일째 저장하였을 때 42.01 mg/g이었다.

Table 4-14에는 3달간 저장한 후에 저장 습도와 온도에 따른 분말 녹차의 아스코르빈산의 변화를 나타내었다. 아스코르빈산은 조사된 저장 조건에서 저장 기간에 따라 대체로 증가하는 경향을 보였다. 3달간의 저장 후에 가장 높은 함량은 상대습도 23%의 조건으로 4℃에서 저장하였을 때 36.9 mg/g으로 저장 초기의 24.2 mg/g에 비하여 약 50% 이상 증가하였다. 한편, 저장 온도를 주된 변수로 보았을 때에는 20℃에서 가장 낮은 아스코르빈산 함량을 보였고, 그 다음이 -20℃, 그리고 4℃의 순으로 측정되었다.

한편, Park 등(2005)은 가공한 녹차를 분쇄하여 7±1%의 20 μm 이하의 가루 녹차를 상온에서 저장하였을 때 60일 이후에 비타민 C (아스코르빈 산)의 함량이 급속히 감소한다고 보고하였다. 본 연구 결과에서도 20℃에 저장한 분말 녹차의 경우에서 아스코르빈산 함량이 가장 낮았으며, 23%와 81%의 상대습도에서는 초기보다 낮은 값을 나타내었다.

Table 4–9. Effect of relative humidity (RH) and storage temperature on total phenolic contents of green tea powder

		(mg/g)								
		Storage Temperature (°C)								
		–20			4			20		
RH Day		0.23	0.69	0.81	0.23	0.69	0.81	0.23	0.69	0.81
0		267.5 3^a	267.53 b	267.53 b	267.53 b	267.53 c	267.53 d	267.53 c	267.53 d	267.5 3 ^d
7		238.95 b	188.95 d	155.03 d	173.06 d	169.57 e	286.33 c	153.29 e	323.83 b	309.5 9 ^c
14		238.27 c	212.98 c	149.70 e	177.81 c	326.06 b	324.12 b	305.13 b	314.43 c	336.4 3 ^b
21		229.65 d	427.9 0^a	420.0 5^a	436.2 4^a	430.6 2^a	398.8 3^a	391.0 8^a	380.6 2^a	392.8 2^a
28		217.93 e	169.28 e	241.67 c	144.38 e	219.57 d	207.85 e	190.21 d	170.83 e	188.6 6 ^e

Table 4–10. Effect of relative humidity, storage temperature and time on total phenolic contents of green tea powder

		(mg/g)	
Relative humidity (%)	Storage temp. (°C)	Storage time (Month)	
		0	3
23	–20	267.5	252.6 ^c
	4	267.5	287.1 ^a
	20	267.5	278.0 ^b
69	–20	267.5	210.6 ^c
	4	267.5	259.3 ^a
	20	267.5	234.9 ^b
81	–20	267.5	211.8 ^b
	4	267.5	251.0 ^a
	20	267.5	205.2 ^c

Different letters (a–c) within a row indicate significant difference (p<0.05), n=3.

Table 4–11. Effect of relative humidity (RH) and storage temperature on total flavanol contents of green tea

		(mg/g)								
		Storage Temperature (°C)								
		-20			4			20		
RH	Day	0.23	0.69	0.81	0.23	0.69	0.81	0.23	0.69	0.81
	0	49.43 ^b	49.43 ^c	49.43 ^c	49.43 ^c	49.43 ^c	49.43 ^b	49.43 ^b	49.43^a	49.43 ^b
	7	29.05 ^d	26.09 ^e	24.35 ^e	19.08 ^e	17.11 ^e	29.50 ^e	15.18 ^e	33.33 ^d	30.95 ^d
	14	51.32^a	54.95 ^b	54.09 ^b	54.75 ^b	49.52 ^b	29.57 ^d	27.20 ^d	40.27 ^c	38.97 ^c
	21	28.26 ^e	57.80^a	58.52^a	58.14^a	64.44^a	61.07^a	51.89^a	49.33 ^b	51.98^a
	28	34.91 ^d	29.14 ^d	41.53 ^d	31.70 ^d	33.75 ^d	33.30 ^c	30.28 ^c	24.24 ^e	25.54 ^e

Table 4–12. Effect of relative humidity, storage temperature and time on total flavanol contents of green tea powder

		(mg/g)	
Relative humidity (%)	Storage temp. (°C)	Storage time (Month)	
		0	3
23	-20	49.4	40.7 ^b
	4	49.4	44.9 ^a
	20	49.4	45.5 ^a
69	-20	49.4	35.9 ^c
	4	49.4	40.3 ^a
	20	49.4	37.3 ^b
81	-20	49.4	36.2 ^b
	4	49.4	41.1 ^a
	20	49.4	30.3 ^c

Different letters (a–c) within a row indicate significant difference ($p < 0.05$), $n = 3$.

Table 4-13. Effect of relative humidity (RH) and storage temperature on ascorbic acid contents of green tea

(mg/g)

RH Day	Storage Temperature (°C)								
	-20			4			20		
	0.23	0.69	0.81	0.23	0.69	0.81	0.23	0.69	0.81
0	24.16 ^d	24.16 ^e	24.16 ^c	24.16 ^c	24.16 ^d	24.16 ^d	24.16 ^d	24.16 ^e	24.16 ^e
7	30.03 ^b	24.88 ^c	21.20 ^d	22.83 ^d	22.90 ^e	22.31 ^e	21.88 ^e	41.36^a	40.33^a
14	27.18 ^c	24.33 ^d	17.88 ^e	22.81 ^e	36.62 ^b	40.19^a	36.86 ^b	39.11 ^b	39.92 ^b
21	22.31^e	42.01^a	40.51^a	39.17^a	37.86^a	35.90 ^b	37.72^a	37.91 ^c	39.21 ^c
28	30.33 ^a	25.04 ^b	36.21 ^b	29.57 ^b	32.04 ^c	31.42 ^c	29.58 ^c	26.19 ^d	27.38 ^d

발효차와 발효차인 우롱차나 홍차에는 발효과정 중에 아스코르빈산이 산화되어 산화형 아스코르빈산을 거쳐 2,3-디게토구론산으로 되며 최종적으로 옥살산 등의 산으로 되지만, 불발효차인 녹차의 경우에는 아스코르빈산 함량이 높고 저장이 잘 되었을 때에는 2-3년간 유지된다(Yamamoto et al., 1997). 본 연구의 결과에서는 분말 녹차의 아스코르빈산이 낮은 습도의 냉장 조건(4°C)에서 비교적 높은 함량이 검출되었으며, 저장 조건이 아스코르빈산 함량에 중요한 영향을 미침을 알 수 있었다.

(4) 분말녹차의 저장 환경이 카테킨 함량에 미치는 영향

카테킨류는 녹차의 주된 생리활성물질로서 각종 성인병과 암 예방에 효과가 있음이 밝혀져 있다. 녹차에 존재하는 카테킨은 에피카테킨류와 그 에피퍼류가 있으며, 에피카테킨류가 주된 카테킨이다 (Fig. 4-5). Table 4-15에 상대습도와 저장 온도를 달리하여 분말 녹차를 3달 간 저장한 후 카테킨류, 갈릭산, 그리고 카페인의 변화를 나타내었다. 모든 조건에서 EGCG와 EGC가 대표적인 카테킨이며, 저장 조건에 따라 변화가 있었다. 상대 습도 23%의 조건에서 EC는 모든 저장 온도에서 저장할수록 증가하였고, 특히 4°C에 저장하였을 때 초기의 0.3 mg/g에서 3달 후에는 11.0 mg/g으로 크게 증가

하였다. 주된 카테킨인 EGC와 EGCG도 대체로 증가하는 경향을 보였는데 4℃의 경우 초기의 16.9와 27.3 mg/g에서 3달 후에는 각각 24.3과 36.5 mg/g으로 증가하였다. 한편, 카페인의 경우에도 증가하는 경향을 보여 4℃에서 저장한 경우에 초기의 20.7 mg/g에서 3달 후에는 30.7 mg/g으로 검출되었다. 한편, Ko 등은 녹차 추출물을 저온에서 저장한 경우에 총 카테킨 함량은 큰 차이가 없었으며, 카페인 함량은 증가하였다고 보고하였다(Ko et al., 2006). 카페인이 증가하는 이유는 아직 밝혀져 있지 않으나 녹차 세포에서 미지의 화학적 변화가 일어나는 것으로 추정된다. Kim 등은 수분활성도를 변화시키며 녹차 잎을 저장하였을 때 수분활성이 높고 저장 온도가 높을수록 갈변화가 빨리 일어난다고 보고하였다(Kim et al., 1988). 이는 녹차의 구성 성분의 화학적 변화가 온도에 민감하며, 이들의 다양한 반응은 녹차 성분의 변화를 초래한다. 상대습도 69%에서 저장한 분말녹차의 경우에는 대부분은 상대습도 23%와 유사한 양상으로 카테킨류들이 변화하였다. 모든 에피카테킨류, 갈릭산, 카페인은 4℃에 저장한 경우에서 가장 높은 양이 검출되었으나, 대부분의 경우에서 상대습도 23%의 경우보다는 낮은 값을 보였다. 또한, 상대습도 81%에 저장한 경우에서도 4℃에 저장한 분말 녹차에서 모든 카테킨류와 갈릭산, 카페인의 양이 가장 높았다. 그러나, 20℃에 저장한 경우에는 카테킨류가 급감하였다. 예를 들어 EGCG의 경우 상대습도 23%, 4℃에서는 저장 3달 후에 36.5 mg/g 이었으나, 상대습도 81%, 20℃에서 3달간 저장한 후에는 11.9 mg/g로 매우 감소하였다. 이러한 결과는 분말 녹차의 상대습도와 저장 온도가 카테킨류 및 카페인의 함량에 매우 민감한 영향을 미치며, 낮은 습도에서 냉장 상태로 저장하는 것이 녹차의 품질 유지에 유리함을 의미한다.

Table 4–14. Effect of relative humidity, storage temperature and time on ascorbic acid contents of green tea powder

(mg/g)

Relative humidity (%)	Storage temp. (°C)	Storage time (Month)	
		0	3
23	–20	24.2	34.9 ^b
	4	24.2	36.9 ^a
	20	24.2	23.2 ^c
69	–20	24.2	30.6 ^b
	4	24.2	34.7 ^a
	20	24.2	29.8 ^c
81	–20	24.2	30.5 ^b
	4	24.2	32.3 ^a
	20	24.2	23.7 ^c

Different letters (a–d) within a row indicate significant difference ($p < 0.05$), $n = 3$.

Table 4–15. Effect of relative humidities and temperatures during storage for 3 months on catechins and caffeine of green tea powder

(mg/g)

Relative humidity (%)	Storage temp. (°C)	Catechins								Gallic acid	Caffeine
		Epicatechins				Epicatechin epimers					
		EC	ECG	EGC	EGCG	C	CG	GC	GCG		
Control		0.3	5.2	16.9	27.3	16.0	0.3	1.3	3.7	1.3	20.8
23	–20	8.6 ^c	7.6 ^b	19.1 ^c	36.1 ^a	1.7 ^a	0.9 ^a	1.6 ^c	1.6 ^b	1.9 ^b	25.4 ^b
	4	11.0 ^a	6.9 ^c	24.3 ^a	36.5 ^a	1.9 ^a	1.2 ^a	2.3 ^a	1.5 ^b	2.6 ^a	30.7 ^a
	20	9.4 ^b	8.5 ^a	22.0 ^b	33.2 ^b	0.5 ^b	1.0 ^a	1.9 ^b	2.0 ^a	2.1 ^b	25.9 ^b
69	–20	6.2 ^c	4.0 ^c	14.8 ^c	23.1 ^c	0.9 ^b	0.4 ^b	1.2 ^c	1.5 ^b	1.5 ^b	20.6 ^c
	4	10.1 ^a	9.2 ^a	22.7 ^a	35.0 ^a	1.8 ^a	1.1 ^a	2.1 ^a	1.1 ^c	2.4 ^a	29.1 ^a
	20	9.4 ^b	7.9 ^b	19.3 ^b	32.1 ^b	1.5 ^a	1.1 ^a	1.7 ^b	1.9 ^a	0.2 ^c	26.4 ^b
81	–20	6.7 ^c	5.8 ^b	16.6 ^b	28.2 ^b	1.1 ^b	0.4 ^b	1.4 ^b	1.4 ^b	1.6 ^b	20.8 ^b
	4	9.9 ^a	9.0 ^a	21.6 ^a	34.6 ^a	1.6 ^a	1.1 ^a	2.0 ^a	1.9 ^a	2.3 ^a	28.5 ^a
	20	7.6 ^b	1.6 ^c	16.6 ^b	11.9 ^c	0.7 ^c	0.7 ^b	1.0 ^c	1.2 ^c	0.3 ^c	20.4 ^b

Different letters (a–c) within each column indicate significant difference ($p < 0.05$), $n = 3$. Control means green tea powder of beginning time of storage.

다. 저장 조건이 녹차 음료의 품질에 미치는 영향

차나무는 차나무과에 속하는 다년생 상록식물로 어린잎이나 순을 가공하여 삼국시대 이전의 고대로부터 널리 음용하여 왔다. 차의 맛은 쓴맛, 떫은 맛, 감칠맛과 단맛이 어우러져 구성되어 있는데, 이는 차잎의 쓰고 떫은맛 성분인 tannin, 쓴맛 성분인 caffeine과 saponin, 감칠맛 성분인 아미노산, 단맛 성분인 당류 등과 여러 향기 화합물들이 혼합된 것이다. 이러한 성분들로 인하여 차는 전 세계의 음료 중에서 오랜 역사를 가진 기호성 식품으로 취급되어 왔으며 커피, 코코아와 함께 3대 기호음료로 160여개 국가에서 널리 음용되고 있다. 녹차는 건강식품으로 인식됨에 따라 1990년대 후반부터 그 소비량이 증가하고 있다.

생리활성을 나타내는 차의 성분 중 카테킨은 떫은맛을 내는 성분이다. 카테킨 성분은 폴리페놀 화합물로서 항산화작용이 큰 물질이다. 폴리페놀성분들의 항산화효과에 대한 연구는 카테킨들의 2,2-azo-bis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)의 azo 프리라디칼 유도 적혈구 용혈에 대한 효과와 (Zhang et al., 1997), 또 flavanols은 항산화 항종양, 항암 활성을 가지고 있다 (Conney et al., 1992). 특히 강력한 생물학적 작용을 가진다고 알려져 있는 epigallocatechin gallate(EGCG)는 여러 종류의 악성 암(Liang et al., 1998; Sachinidis et al., 2000), 퇴행성 질환(Koh et al., 2004; Katiyar et al., 2001)에서 연구된 결과가 보고되어져 있다. 하지만 암조직에서는 EGCG가 암세포의 자연사를 촉진한다고 알려져 있지만(Peng et al., 2006), 반면 신경변성질환이나 피부질환에서는 해로운 외부자극에 의한 세포자연사를 방지하는 것으로 보고되었다(Williams et al., 2004; Balasubramanian et al., 2002). 이러한 효과들에 의해서 녹차는 단순히 음료가 아닌 건강 기능성 음료로 많은 사람들이 음용하고 있다.

녹차는 가공한 잎, 분말, 티백, 녹차 음료 등으로 소비자들에게 공급되고 있다. 간편성을 위해 근래에 패트병 형태의 녹차 음료가 증가하고 있다. 녹차 음료는 제조방법에 따라 유용 성분의 추출 함량에 따라 차이가 있는데 이 중 가열 공정과 저장 조건에 따라 플라바놀 성분 및 관능적 특성이 영향을 받는다 (Wang et al., 2000). 이러한 것은 녹차에 존재하는 다양한 성분들의 외부 조건에 민감하기 때문이다. 본 연구에서는 빛의 차단 유무, 공기를 질소로의 치환 유무, Vit C 첨가 유무에 따라 3가지 형태로 녹차 음료를 저장하면서 녹차의 유효성분 및 항산화력의 변화를 분석하였다(Table 4-16).

(1) 총 페놀 함량과 총 플라바놀 함량의 변화

식물에는 2차대사 산물의 하나인 페놀성 화합물이 함유되어 있는데, 이들은 수산기를 통한 수소 공여와 페놀 고리 구조의 공명 안정화에 의해 항산화 등의 생리활성을 나타낸다. 녹차에는 플라바놀, 플라바노이드, 페놀산 등의 여러 종류의 폴리페놀 화합물이 함유되어 있으며, 이러한 폴리페놀 화합물들은 녹차 중에서 생물학적으로 가장 활성 성분이며, 플라바놀은 녹차의 주된 폴리페놀 화합물이다 (Cespy and Williamson, 1994). 저장 조건을 달리한 녹차 음료를 28일간 저장하면서 측정된 총페놀 함량과 총 플라바놀 함량을 Table 4-17와 Table 4-18에 각각 나타내었다.

총페놀 함량의 경우, A 녹차 음료(빛 무차단, 질소 무충전, 비타민 C 무첨가)는 B 녹차 음료(빛 차단, 질소 충전, 비타민 C 첨가)와 C 녹차 음료(빛 차단, 질소 충전, 비타민 C 무첨가)에 비해 빨리 감소하였다 (Table 4-17). 28일간 저장한 후의 경우를 비교해 보면 저장 초기의 페놀 함량을 100%라 할 때 A 녹차는 71.5%, B 녹차는 73.9%, C 녹차는 75.1%이었다. 이 결과는 빛, 질소, 비타민 C가 녹차의 페놀 함량에 영향을 미침을 의미하며, B 녹차와 C 녹차 사이에는 페놀 함량이 큰 차이가 없으므로 보아 비타민 C 첨가 여부는 거의 영향을 주지 않음을 알 수 있었다. 녹차의 페놀 화합물은 저장 기간이 늘어날수록 갈변물질의 생성되는 중간물질인 catechol, hydroquinone 등의 방향족 reductone에 의한 것이라 보고되었다 (Choi et al., 2000). 이러한 변화는 저온에서 많이 억제될 수 있는데, 본 연구는 모든 저장 조건이 4°C에서 행해졌으므로 빛, 질소 치환, 비타민 C 등의 효과를 뚜렷하게 구분하기 어려웠다.

한편, 총 플라바놀의 경우에는 A 녹차 음료는 저장 초기에 비해 거의 변화가 없었으며 (100.4%), B 녹차 음료와 C 녹차 음료는 각각 96.2%와 96.0%로 약간 감소하였다 (Table 4-18).

(2) DPPH 라디칼소거능의 변화

DPPH는 분자 내에 위치한 안정한 라디칼을 함유하지만 항산화활성이 있는 물질과 만나면 안정한 라디칼로 환원되면 짙은 자색이 탈색됨으로써 항산화 물질의 수소공여능을 측정하는데 널리 이용되고 있다.

각 녹차 음료를 28일간 저장한 후에 DPPH 라디칼 소거능을 측정하여 Table 4-19에 나타내었다. A 녹차 음료는 저장 초기에 비하여 28일 후 87.9%의 라디칼 소거능을 보였으며, B 녹차 음료와 C 녹차 음료는 각각 92.9%와 88.4%를 나타내었다. 이로써 B 녹차 음료가 28일간 저장한 후에 가장 높은 라디칼 소거

Table 4-16. Storage conditions of each green tea beverage

	Light ¹⁾	N ₂ gas ²⁾	Vitamin C ³⁾
A	(+)	(-)	(-)
B	(-)	(+)	(+)
C	(-)	(+)	(-)

¹⁾(+) means stored at not-artificially excluding natural light condition, and (-) means stored at artificially excluding natural light condition by wrapping a vial with aluminium foil.

²⁾(+) means stored at nitrogen filling up condition, and (-) means stored at natural air condition.

³⁾(+) means stored with addition of 30 mg/100 mL of vitamin C, and (-) means stored with no addition of vitamin C.

Table 4-17. Effect of the total phenolic contents(TPC) of three green tea beverages stored at different conditions (Unit: %)

Storage Time (days)	Green Tea Beverages		
	A ¹⁾	B	C
0	100±2.02	100±0.70	100±0.47
28	71.5±1.65	73.9±0.35	75.1±0.75

¹⁾refer Table 1 for storage conditions

Table 4-18. Effect of the total flavanol contents(TFC) of three green tea beverages stored at different conditions

(Unit: %)

Storage Time (days)	Green Tea Beverages		
	A	B	C
0	100±0.17	100±0.17	100±0.51
28	100.4±0.19	96.2±0.04	96.0±0.14

¹⁾refer Table 1 for storage conditions

Table 4-19. Effect of the DPPH radical scavenging of three green tea beverages stored at different conditions (Unit: %)

Storage Time (days)	Green Tea Beverage		
	A	B	C
0	100±0.97	100±0.80	100±1.81
28	87.9±1.56	92.9±0.29	88.4±1.44

¹⁾refer Table 1 for storage conditions

활성을 나타냄을 알 수 있었는데, B 녹차 음료는 빛이 차단되었고 질소 충전으로 용존 산소를 제거하였으며 비타민 C를 첨가한 경우이다. C 녹차 음료는 빛 차단 및 질소 충전되었지만 비타민 C가 첨가되지 않은 경우이다. C 녹차 음료는 B 녹차 음료보다는 낮은 라디칼 소거 활성을 보였지만 A 녹차 음료와는 비슷하여 비타민 C 첨가가 라디칼 소거 활성에 가장 중요함을 알 수 있었다.

(3) 카테킨류 함량의 변화

녹차에는 4 종류의 epicatechin이 존재한다 (Fig. 4-5). 이 중, (-)-epigallocatechin (EGC)와 (-)-epigallocatechin gallate (EGCG)는 녹차 주된 epicatechin이며, 특히 EGCG는 항산화효과, 심장병 예방효과, 항균효과 등 다양한 기능성을 담당하는 것이 보고되어 있다 (Nagle et al., 2006; Wolfram, 2007). 녹차 음료를 28일간 저장한 후, EGC와 EGCG의 함량을 조사하였다 (Table 4-20). A 녹차 음료의 경우 저장 초기에 비하여 EGC는 76.6%로 감소하였지만 EGCG는 130.6%로 크게 증가하였다. B 녹차 음료도 EGC는 48.7%로 크게 감소하였고, EGCG는 136.5%로 크게 증가하였다. C 녹차 음료는 모두 감소하여 EGC는 48.1%로, EGCG는 43.0%로 감소하였다. 이는 빛, 질소, 비타민 C가 녹차의 카테킨 함량에 매우 중요한 인자임을 의미한다.

(4) 카페인 함량의 변화

녹차의 카페인은 중추신경 흥분, 호흡 흥분, 이뇨, 피로회복의 효력이 있다. 28일간 저장된 각 녹차의 카페인을 분석하여 Table 4-21에 나타내었다. A 녹차 음료의 경우 저장 초기에 비하여 카페인 함량은 103.8%로 증가하였다. B 녹차 음료도 128.4%로 크게 증가하였으나, C 녹차 음료는 103.4%로 미약하게 증가하였다. B 녹차 음료는 A, C 녹차 음료에 비해 비타민 C가 첨가된 차이점이

있다. C 녹차 음료는 A 녹차 음료에 비해 빛을 차단하고 질소도 충전하였으나 A 녹차 음료와 큰 차이점을 보이지 못했다. 이는 녹차 음료의 카페인 함량에는 비타민 C가 크게 기여함을 시사한다.

한편, Ko 등(4-19)은 녹차 추출물을 저장한 경우에 카페인 함량은 증가하였다고 보고하였는데, 저장 조건은 다소 차이가 있지만 본 연구에서와 같이 4℃에서 4주간 저장하였을 때 저장 초기에 비하여 22.5%의 카페인이 증가함을 확인하였다. 카페인이 증가하는 이유는 아직 밝혀져 있지 않으나 녹차 세포에서 미지의 화학적 변화가 일어나는 것으로 추정된다.

Table 4-20. EGC and EGCG contents of three green tea beverages stored at different conditions

(Unit: %)

Storage Time (days)		Green Tea Beverages		
		A ¹⁾	B	C
0	EGC	100±0.01	100±0.08	100±0.01
	EGCG	100±0.01	100±0.00	100±0.02
28	EGC	76.6±0.96	48.7±0.44	48.1±0.37
	EGCG	130.6±0.00	136.5±0.00	4.3±0.02

¹⁾refer Table 1 for storage conditions

Table 4-21. Caffeine contents of three green tea beverages stored at different conditions

(Unit: %)

Storage Time (days)		Green Tea Beverages		
		A ¹⁾	B	C
0		100±0.01	100±0.03	100±0.01
28		103.8±1.76	128.4±1.03	103.4±0.68

¹⁾refer Table 1 for storage conditions

라. 저장방법(원적외선 및 감마선 조사, 진공 및 상대습도 포장)이 생리활성물질에 미치는 영향조사

녹차 제품의 저장방법이 생리활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 감마선 5kGy를 조사한 잎녹차와, 90℃에서 30분간 원적외선을 처리한 잎녹차를 25℃에서 빛을 차단한 조건에서 진공포장 또는 상대습도 81%의 상태로 3달간 저장한 후 분석하였다. 저장 후, 각 잎녹차는 앞의 경우와 같이 1.5 g에 증류수 100 ml을 가하여 70℃에서 5분간 추출한 후 생리활성을 측정하였다.

(1) 저장 방법이 총 페놀 함량과 총 플라바놀 함량에 미치는 영향

Fig. 4-6에 무처리구, 감마선 처리구, 원적외선 처리구 녹차를 각각 진공 또는 상대습도 81%에서 3개월 저장한 후에 총 페놀 함량과 총 플라바놀 함량의 변화를 나타내었다. 무처리구의 경우 진공상태에서는 저장한 후에 페놀 함량이 증가하였고, 습도 81%의 조건에서는 감소하였다. 원적외선 경우에는 저장한 후에 모두 감소하였지만 진공상태에 저장한 경우에 더욱 높은 페놀 함량을 나타내었다.

한편, 모든 경우에서 3달간 저장한 후에 플라바놀 함량이 감소하였으며, 진공상태에 저장한 녹차제품이 상대습도 81%에 저장한 경우보다 높은 플라바놀 함량을 나타내었다.

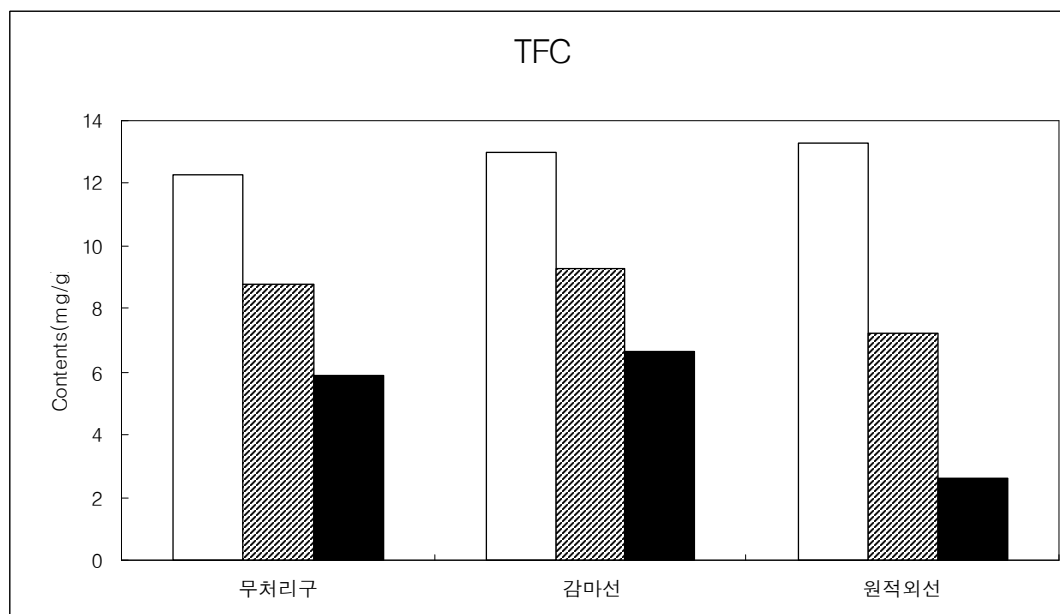
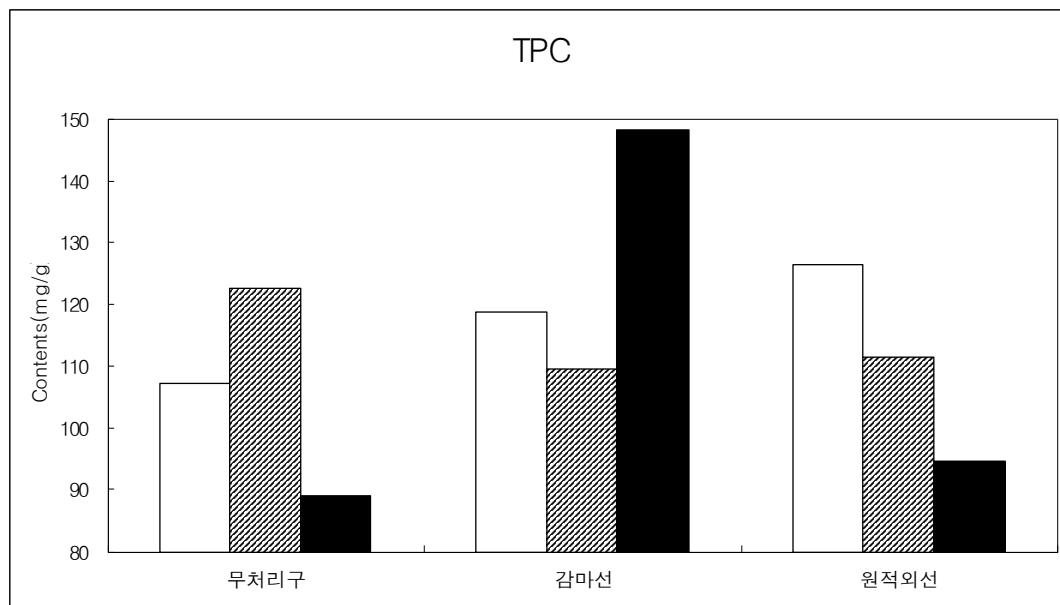
(2) 저장 방법이 EGC, EGCG 및 카페인의 함량에 미치는 영향

Fig 4-7에 녹차의 저장 환경이 EGC와 EGCG의 함량에 미치는 영향을 나타내었다. EGC는 모든 경우에서 상대 습도 81%에서 저장한 경우에 증가하였다. 감마선을 조사한 녹차제품에서는 진공상태로 저장한 경우에도 매우 높게 EGC가 증가하였다.

한편, 녹차의 가장 중요한 생리활성물질인 EGCG는 진공의 효과가 극명히 나타났다. 모든 조건에서 진공 상태에 저장한 결과, EGCG는 급격히 증가하였다. 그러나, 상대습도 81%에 저장한 경우에는 진공상태에 저장한 경우보다 매우 낮은 함량의 EGCG가 검출되었다.

카페인의 경우는 Fig. 4-8에 나타낸 바와 같이 3개월 저장 후에 모든 조건에서 저장 초기보다 증가하였다.

Fig. 4-6. Total phenolic contents (TPC) and total flavanol contents (TFC) of green tea powders stored at several different conditions



0 month,
 3 months in vacuo, and
 3 months in 81% of relative humidity

Fig. 4-7. The contents of (A) EGC and (B) EGCG of green tea powders stored at several different conditions

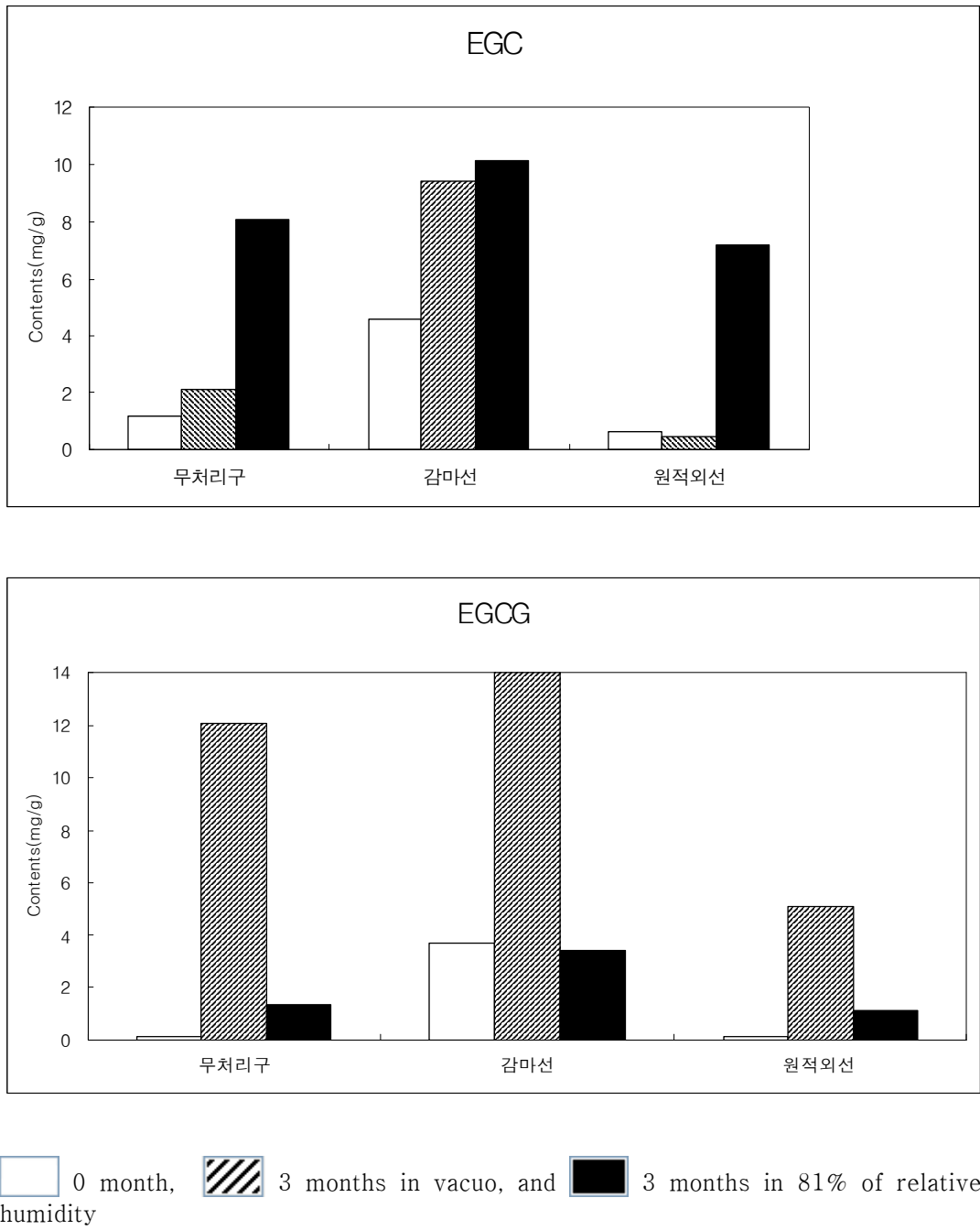
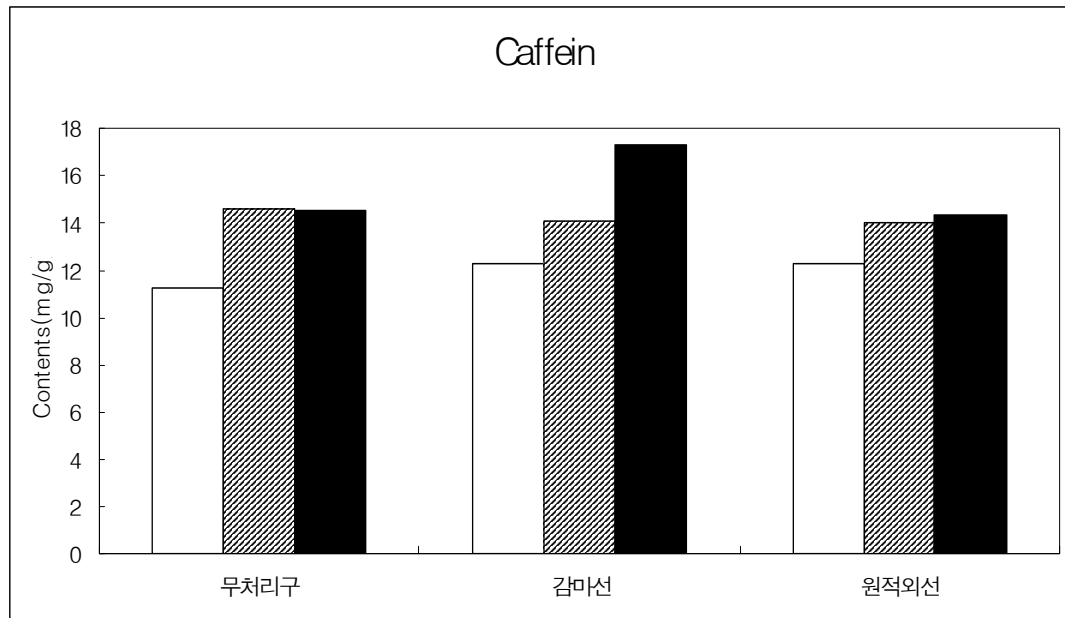


Fig. 4-8. The contents of caffeine of green tea powders stored at several different conditions



□ 0 month, ▨ 3 months in vacuo, and ■ 3 months in 81% of relative humidity

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

녹차의 수입 및 생산량 증가 등으로 인하여 어려움을 겪고 있는 국내 녹차 산업을 활성화하기 위하여 매실에 있는 기능성물질과 가공기술 개발을 최종 목표로 하여 추진한 연구과제는 표 에 정리된 바와 같이 연도별 연구목표에 근거하여 성공적으로 수행할 수 있었다.

표. 연도별 계획에 근거한 연구목표의 성취도

구 분	평가의 착안점 및 성취도	
	착 안 사 항	성취도
1차 년도 (2007)	○ 녹차제품(분말, 잎차, 음료)의 저장환경에 따른 물리적, 관능적 특성 조사	○ 녹차엽의 저장환경에 따른 특성 분석 : 상대습도가 69, 81%인 환경조건에서 가용성 고형분, 환원력이 저장에 따라 감소 ○ 녹차 분말의 저장환경에 따른 특성 분석 : 상대습도가 69, 81%인 환경조건에서 가용성 고형분, caking behavior(몽침현상)이 크게 증가 *. 상대습도가 높은 조건에서의 저장시 녹차엽과 분말의 저장안정성을 유지 할 수 있는 저장방법의 개선 필요. 2년차 연구에서 진공포장에 따른 녹차분말의 저장안정성 분석 ○ 녹차 침출액의 저장환경에 따른 특성 분석 : 냉장저장시에 항산화 활성, 외관, 색도 등의 물리화학적 특성이 저장기간동안 변화없이 유지. 냉장저장이 녹차 침출액의 저장에 가장 적합.
	○ 녹차추출물의 조제 및 항균력 검사 ○ 녹차추출물의 항균작용 구명	○ 녹차추출물을 조제하고 항균력 검사 및 항균작용 구명
	○ 세포사멸에 대한 보호효과 ○ 세포막 손상 변화 측정	○ 녹차 저장 조건 (저장기간 및 수분활성도)에 따른 A β -induced neurotoxicity에 대한 PC12 cell 보호 효과 검증 ○ A β -induced neurotoxicity에 의한 neuronal cell membrane toxicity를 LDH, Trypan blue assay를 통해 검증

구 분	평가의 착안점 및 성취도	
	착 안 사 항	성취도
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 저장환경이 녹차 제품의 생리활성 성분에 미치는 영향 동향 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 녹차제품의 생리활성 물질 측정법 확립 유무 ○ 저장 환경이 녹차제품의 생리활성물질에 미치는 영향 조사 ○ 총 페놀 함량, 총 플라바놀 함량 여부 ○ 카테킨 함량, vit C 분석 여부
2차 년도 (2008)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 녹차제품의 고품질 유지를 위한 최적 저장 방법 확립 ○ 녹차 분말 음료의 제조 공정 확립 ○ 추출공정 개선을 통한 녹차 유용성분 추출효율 증대 ○ 고기호성 녹차음료 제조를 위한 추출조건 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 진공포장에 따른 녹차 분말의 저장안정성 증대 : 녹차분말의 저장에 있어 가장 열악한 조건인 상대습도 81%의 조건에서 가용성 고형분, 색도, 외관, 항산화 활성이 저장시 일정하게 유지되었고, caking behavior(몽침현상)의 경우 대조구에서 약 13%에서 84%까지 증가한데 반해 진공포장한 시료에서는 일어나지 않았음. 진공포장이 녹차 분말의 저장시 안정성 증대에 적합. ○ 감마선, 원적외선 처리에 따른 저장안정성 분석 : 감마선 조사와 원적외선 처리에 따른 물리화학적 특성의 유의적인 차이는 없었음 ○ 초음파 추출법에 의한 녹차 유용성분 추출 효율 증대 : 초음파 추출로서 가용성 고형분, catechins, 총페놀화합물함량, flavonol compound의 함량 등 녹차의 유용성분의 추출을 증대시킬수 있는 것으로 분석됨 ○ 고기호성 녹차음료 추출조건 : 반응표면분석법을 통해 분석한 결과, 녹차의 기호성을 나타내는 척도가 되는 N/T value(총질소화합물/총탄닌)가 약 56~64℃에서 18분 미만으로 추출할 경우에 가장 높게 나타나 고기호성 녹차음료의 제조를 위한 최적 조건으로 도출됨. ○ 녹차 분말음료의 제조공정 확립 및 저장 안정성 분석
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 녹차추출물의 안전성 검사 ○ 항균성분의 분리 및 동정 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 녹차추출물의 안전성 검사와 항균성분의 분리 및 동정
	<ul style="list-style-type: none"> ○ PC12 cell로부터 신경전달 대사 관련 효소 (AChE) 추출 분해 효소 (AChE) 저해능 변화 측정 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 뇌신경전달 물질로서의 acetylcholine (ACh) 분해대사에 관련된 효소 (AChE; acetylcholinesterase) 분해활성 측정을 위해 신경세포주로부터 ACh preparation
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 저장 방법이 녹차의 생리활성에 미치는 영향 조사 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 녹차저장 방법이 생리활성에 미치는 영향 조사 ○ 총 플라바놀 함량 여부 ○ 카테킨 함량, vit C 분석 여부 ○ 추출방법 및 조건에 따른 생리활성물질의 함량 분석 유무

최종 평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 저장조건에 따른 항산화성 검증 ○ 저장 방법에 따른 acetylcholine 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 저장조건 (저장기간, 저장온도, 수분활성도)에 따른 잎 녹차와 분말녹차 열수 추출물의 항산화효과 검증 ○ 신경세포주인 PC12 cell line에서 추출된 ACh를 대상으로 저장 조건별 잎 녹차와 분말 녹차 추출물의 분해효소 (AChE)저해 활성 검증
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 녹차추출물의 항균작용 구명 및 안전성 검사 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 녹차추출물의 안전성 검사와 항균성분의 분리 및 동정
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 저장 방법에 따른 녹차 제품의 생리활성능 (뇌신경질환) 변화조사 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 저장조건 (저장기간, 저장온도, 수분활성도)에 따른 잎 녹차와 분말 녹차 열수 추출물의 퇴행성 뇌신경 질환으로서의 치매에 대한 효과 검증
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 녹차제품의 저장에 따른 생리활성물질 변화조사 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 녹차의 저장환경, 방법에 따른 생리활성변화(총페놀, 플라바놀, 카테킨 등)

제 2 절 관련 분야 기술 발전에의 기여도

- 녹차엽, 분말 및 녹차침출액의 저장안정성: 각각의 유형별 녹차 제품의 저장에 따른 특성 변화에 대한 연구가 되어 있지 않아 참여기업인 (주) 햇차원을 비롯한 녹차 생산 기업에서는 그에 따른 예로 사항이 많았다. 본 연구에서 녹차엽과 분말 제품의 저장 특성을 분석한 결과, 상대습도가 69, 81%의 높은 조건에서는 저장에 따라 유용성분, 항산화, 물리적 특성 등이 현저히 낮았다. 그리고 녹차 침출액의 경우 냉장저장이 다른 조건, 즉 상온저장, 공기출입, 광선 차단 등의 저장환경에 비해 안정성 유지에 가장 적합함을 알 수 있었고, 상온에서 ascorbic acid를 첨가한 경우, 냉장저장한 경우에 가까운 안정성을 보였다. 따라서 본 연구결과를 통해 참여기업인 (주) 햇차원에서는 녹차제품 생산 및 저장을 위한 guide-line을 확보 할 수 있으리라 판단된다.
- 녹차 분말 제품의 진공포장 효과: 최근 녹차 분말을 바로 용해시켜 간편하게 음용할 수 있도록 하는 제품이 많이 선호되고 있다. 그런데, 본 연구의 1년차 연구결과에서 나타난 바와 같이 상대습도가 높은 환경에서는 흡수에 의한 caking 현상 발생하여 분말의 flowability를 감소시켜 유용성을 감소시킨다. 따라서 녹차 분말의 경우 제조 후 유통과정에서 상대습도가 높거나 일정하게 유지되지 않는 환경적 요인으로부터 분말의 물리적 특성을 유용한 상태로 유지할 수 있도록 해야한다. 본 연구를 통해 진공포장에 의해 녹차 분말 제품의 flowability 등에 따른 originality가 유지되는 것으로 나타났기 때문에 매우 중요한 연구결과라고 생각되며, 이 방법은 참여기업인 (주) 햇차원 뿐만 아니라 관련기업에서도 바로 실용화가 가능하기 때문에 생산성 향상에 매우 큰 기여를 할 것으로 판단된다.
- 초음파 추출을 통한 추출공정 개선: 초음파 추출을 통해 같은 온도에서 추출하더라도, 가용성 고형분, catechins, 총페놀화합물 함량, flavonol compound 함량 등의 녹차의 유용성분의 추출효율을 증대시킬수 있는 것으로 나타났다. 따라서, 본 기술을 녹차 관련 업체에서 활용하여 추출 생산할 경우, 생산성을 크게 증대시킬수 있을것으로 판단된다.
- 고기호성 음료제조를 위한 추출기술: 일반적으로 기호성이 높은 고품질 녹차의 경우 특유의 쓴맛이나 떫은 맛보다 단맛이나 감칠맛 등의 순한 맛이 우세하다. 따라서, 이 기호성을 나타내는 파라미터인 N/T value(총 탄닌 함유량에 대한 총 질소 함유량의 비)를 침출조건에 따라 측정하여, 반응표면분석을 통해 최적화한 결과, 침출온도가 56~64℃, 침출시간이 18min 미만인 경우 N/T값이 37로 가장 높은 것을 확인하였다. 결론적으로, 고기능성 녹차 음료의 제조에는 56~64℃의 온도에서 약 18분 미만으로 침출하는 것이 가장 적합한 조건인 것으로 판단된다. 따라서, (주)햇차원을 비롯한 녹차관련기업에서 본 추출조건을 이용해 고기호성의 녹차음료를 생산할 수 있으리라 판단된다.

- 녹차 분말 음료의 제조기술: 현재 녹차음료를 포함한 기능성음료는 주로 추출액의 상태로 생산 판매되고 있으나, 최근에는 최신공정기술인 초미쇄 분쇄를 이용하여 미립분말 음료제품(홍삼, 인삼 분말음료_한뿌리) 등도 출시되고 있다. 또한, 기능성 소재의 일부인 추출음료 보다는 소재 전체를 응용하는 분말음료 형태를 선호하는 추세이다. 하지만, 분말음료제품을 개발하기 위해서는 분말의 부유허성 개선 및 저장 중 침전 방지 등의 기술들이 선행되어야만 가능하다. 따라서 본 연구에서 초미쇄 분쇄 공정 없이 비교적 큰 입자 상태로도 분산성이 우수한 녹차분말음료제조가 가능한 지 검토하기 위하여, 실험실 조건 하에서 침전방지 부재료 및 혼합배율 조절을 통하여 녹차분말의 현탁액 저장 안정성을 규명, 검토하였으며, 또한, 본 애로기술연구를 통하여 제품화를 위한 기초제조공정을 구축하였다. 고품질 녹차를 생산하는 농가 및 기업에서 잉여 원료를 이용해 이와 같은 녹차 분말 음료를 생산할 경우 큰 부가가치를 창출 할 것으로 판단된다.

- 천연 항균 물질에 대한 기술 확보

녹차추출물로부터 항균력이 매우 뛰어나고 안전성도 우수한 GTE를 개발하였다. GTE를 농산물, 축산물, 수산물에 적용하였을 때 우수한 항균력을 발휘하였으며, 이를 통해 일반 가공 식품에 응용할 수 있는 천연 항균 물질이 될 수 있음을 본 연구에서 확인하였다. 앞으로 관련 업체에서 적절한 가격으로 GTE가 공급된다면 기존의 합성 항균물질에 대체할 수 있을 것이다.

- 퇴행성 뇌신경 질환으로서의 치매에 대한 녹차 제품의 최적 성상 및 저장 검증 및 *in vitro* 검증 system 확립

- 최적 성상 결과: 뇌신경세포 보호효과, 항산화 효과, 뇌신경 전달물질 분해대사에 관련된 효소 (acetylcholinesterase) 활성 저해효과에 대한 결과를 종합하면 다음과 같다. 첫째, 잎 녹차보다 분말 녹차의 생리활성이 각 저장조건에 관계없이 우수한 것으로 나타났다. 이는 EGCG 등을 포함한 catechin류의 생리활성 성분의 추출 효율에서 기인된 것으로 판단된다. 둘째, 저장기간이 짧을수록 기능성은 우수하였다. 특히 뇌신경세포 보호효과와 뇌신경 전달물질의 분해대사에 관련된 효소의 저해활성 측면에서 뚜렷이 발생되었고, 항산화 효과는 저장 기간 보다는 처리 농도에 크게 영향을 받은 것으로 판단된다. 셋째, 3개월 이상의 장기 저장에서는 냉동저장 (-20℃)이 냉장 (4℃)조건보다 우수한 생리활성을 보여 주었다. 결국 소비자가 녹차를 구매하여 가정에서 저장 시에도 상온이나 냉장 보다는 냉동조건의 저장이 녹차 기능성의 유지 측면에서 더 우수할 것으로 판단된다. 넷째, 수분활성도에 의한 차이는 상대적으로 미비하였다. 수분활성도 0.81의 경우가 다른 수분활성도 조건보다는 다소 우수한 것으로 보이지만 이는 통계적인 유의성을 고려할 때 그렇게 큰 영향요인으로 보이지는 않는다.

- *in vitro* system: 퇴행성 뇌신경 질환으로서의 치매는 oxidative stress에서 시작되는 neurotoxicity에서 기인된다는 점에 착안하였고 그러므로 저장 조건별

항산화능을 3가지 방법으로 나누어서 검증을 실시하였다. 이어서 oxidative stress를 유발하는 치매 독성원 (A β -protein)에 의한 뇌신경세포 사멸이 발생되어 치매의 질환의 진전되므로 이에 대한 신경세포 보호효과를 저장조건별 추출물을 활용하여 검증하였다. 이와 함께, 치매 환자의 뇌에서는 정상인에 비해 뇌 신경전달물질인 acetylcholine (ACh)의 생리적 농도가 매우 낮다는 보고가 있고 현재의 예방 및 치료약품도 이 점에 집중되고 있으므로 ACh 분해효소 (AChE)에 대한 녹차 추출물의 저해활성도 검증하였다. 위 3가지 *in vitro* assay system을 활용하여 치매 예방에 대한 최적의 녹차 성상 및 저장조건을 확보할 수 있었다.

- 위 결과는 녹차가 갖는 기존의 생리활성 효과이외에 추가적인 기능성을 과학적으로 확보한 것으로, 기능성 소재를 함유하여 그 활용도가 매우 높은 녹차 산업의 다양성을 확보하는데 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

- 녹차의 최적 저장조건 및 성상 확립 이외에 위 결과를 바탕으로 소재 산업화로 녹차 산업을 발전시킨다면 최근 침체된 녹차시장의 활성화에 기여할 뿐 아니라 관련 농가의 소득 증대에도 기여하여 농업 산업 경쟁력 확보에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

- 녹차의 생리활성물질 유지에 대한 기술 확보 : 녹차에 존재하는 생리활성물질을 총페놀, 총 플라바놀, 아스코르브산, 카테킨 함량 등을 대상으로 저장 환경에 따른 변화를 분석하였다. 아울러 이러한 생리활성물질로 인해 유도되는 생리활성을 라디칼소거능, 환원력, 아질산 소거능으로 확인하였다. 그 결과 잎녹차, 분말녹차, 녹차 음료 등에 대한 최적 조건을 확인하였으며, 이러한 기술은 녹차의 품질 유지에 매우 유용하게 이용될 수 있다. 앞으로 관련 업체에서 보완 연구되면 무한히 넓은 시장에서 경쟁력을 확보할 수 있을 것이다.

- 녹차산업육성을 위한 가공정책의 수립

본 연구에서는 녹차가공식품의 생산현황을 조사하고 소비자의 구매패턴과 선호를 규명함으로써 신제품 개발기술 방향과 수요확대를 위한 마케팅전략을 제시하였다. 연구결과는 녹차의 가공정책 수립에 필요한 기초자료를 제공하며, 선호도분석 등을 통하여 녹차가공식품에 대한 기술개발 투자의 방향을 제시하는데 참고자료로 활용될 것이다. 또한 소비자 선호에 부합하는 제품 개발을 통하여 새로운 녹차가공식품에 대한 수요를 창출함으로써 녹차에 대한 가공수요 확대 및 녹차산업의 성장에 기여할 것으로 기대된다.

- 녹차 생산 농가의 소득 증대

녹차의 건강 유익성 재발견 및 이용성 다양화를 통한 소비 확대를 통하여 매실 생산 농가들의 수익을 증대시킬 수 있다. 특히 근래들어 녹차가 과잉 생산되는 경향이 있어 농가들의 근심이 높아지고 있는데 본 연구에서는 이에 대한 한 해결 방안을 제시하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 녹차 제품의 저장 안정성을 분석한 연구결과를 토대로 논문을 작성하여 한국식품저장유통학회에 논문을 투고할 계획이며 또한, 식품 관련 학회에서 연구결과를 발표할 계획이다.
2. 참여기업인 햇차원에 녹차 제품의 제조 및 유통과 관련된 녹차엽, 분말, 침출액 등의 저장안정성에 관한 기술이전을 실시하여 실제적으로 적극 활용할 수 있도록 하고, 관련 생산 농가의 부가가치 창출에 기여할 수 있도록 지원한다.
3. 향후에도 지역의 녹차 생산 농가 및 기업의 생산성 향상을 위해 연구 결과의 교육 및 기술지도를 실시할 계획이다.
4. 또한 연구과제를 수행하는 동안 양성된 전문인력을 참여기업인 햇차원을 비롯한 지역의 관련기업, 그리고 하동녹차연구소로 취업 및 기술과건을 유도하여 연구의 지속성을 유지할 수 있도록 한다.
5. 참여 기업에 본 과제에서 연구 개발된 각종 제품들에 대한 기술 이전 및 정보를 제공할 것이다. 참여 업체의 준수사항은 크게 두 부분으로 나눌 수 있다. 첫째, 본 연구에서 개발된 각종 녹차 가공 제품에 대한 기술을 이전하여 이들 제품 생산을 활성화시키고 관련 농가 소득에 기여하여야 한다. 둘째로 본 과제에서 연구된 천연 향균물질 및 천연 항산화물질을 계속 연구하여 기능성 소재로 이용될 수 있도록, 이 부분의 실용화에 최선을 다 해야 할 것이다
6. 2차년도 연구결과인 ‘항산화 및 뇌신경전달 물질의 분해대사에 관련된 효소 (acetylcholinesterase) 저해 효과 결과’를 요약하여 한국식품과학회 및 한국식품저장유통학회에 2편을 투고할 계획이다.
- 7 더불어 동 결과를 2009년에 개최되는 한국뇌신경과학회와 한국식품영양과학회에서 발표할 계획이며, 1~2차년도 연구를 진행하는 동안 양성된 전문인력 (post doc. 1명, 석사과정 대학원생 3명, 그리고 학부학생 4명 등)의 관련기업 취업·기술과건 등을 유도하여 산학연 네트워크 활성화 구축이 필요할 것으로 판단된다.
8. 녹차 관련 과제에서 확보한 연구결과는 타 과제와 통합 정리하여 필요 부분은 특허 출원할 계획임. 관련 특허는 참여기업인 햇차원에 기술이전을 실시하여 산업체에서 적극 활용할 수 있도록 지원한다.
9. 과제가 종료된 후에도 지역에 위치한 하동녹차연구소와 함께 지역 녹차 생산 농가 및 기업을 대상으로 연구결과에 대한 지속적인 교육·홍보 자료로 활용할 계획이다.
10. 또한 녹차의 고품질 산업화를 위해서는 기존 제품의 고부가가치화 및 제품 다양화 노력이 필요하다고 판단되므로, 과제를 통해 양성된 전문 인력 지원을 통한 산학연 network를 구축한다.

본 과제는 녹차제품의 관능적, 생리활성 기능성 품질을 유지하기 위해 다양

한 저장 환경을 설정하고 그에 따른 품질을 분석하여 우수한 저장 환경을 발굴하고, 이를 통해 소비자들의 기호성에 맞는 제품을 생산 공급함으로써 녹차 생산 농가들의 소득 증대에 기여하는 것이 목표이다. 따라서 본 과제에서 연구 개발된 각종 정보 및 산업화 기술을 다양한 경로를 거쳐 관련 업계와 연계하여 홍보하고 산업화를 시도할 계획이다. 그 세부 내용은 다음과 같다.

1. 관련 업체에 대한 기술이전 및 자료 제공: 본 과제에는 햇차원이라는 녹차 가공 전문업체가 참여하고 있으므로 이 업체를 대상으로 본 과제에서 연구 개발된 각종 제품들에 대한 기술 이전 및 정보를 제공할 것이다. 참여 업체는 크게 두 부분으로 나눌 수 있다. 첫째, 본 연구에서 개발된 각종 녹차 가공 제품에 대한 기술을 이전하여 이들 제품 생산을 활성화시키고 관련 농가 소득에 기여하고자 한다. 둘째로 본 과제에서 연구된 천연 향균물질 및 천연 향산화물질을 계속 연구하여 기능성 소재로 이용될 수 있도록 관련 업체에 정보를 제공한다. 이 부분은 실용화를 위해 아직 계속 연구가 되어야 할 부분이 많으므로 연구 시설이 보유된 업체에 기술 이전이 되어야 할 것이다.

본 과제에서 연구 개발된 가공식품의 구매 패턴에 관한 조사 분석결과는 시장성 있는 녹차가공식품의 가공정책 수립에 필요한 기초자료를 제공할 것이다. 또한 녹차가공식품의 선호도에 관한 분석정보는 녹차가공식품의 제품개발 방향 및 기술개발 투자의 계획을 수립하는데 유용한 자료로 활용될 것이다.

녹차가공식품의 구매결정요인 분석은 주요 연구 결과는 관련학회지에 (1) 순위프로빗모형에 의한 녹차가공식품의 소비자 선호 분석 (2) 컨조인트분석에 의한 녹차가공식품의 제품개발 방향이라는 주제로 논문으로 제출될 계획이다.

2. 논문 발표를 통한 홍보 : 본 과제에서 연구 개발된 정보를 논문 발표를 통해 홍보함으로써 일반 소비자들이 녹차 저장 조건에 대한 관심을 가지도록 유도한다. 특히 본 과제에서 집중적으로 연구된 우수한 저장 조건과 참여업체의 기술의 연계를 보도하게 하여 녹차 업계 차원에서 녹차 제품의 저장 조건에 관심을 갖도록 유도하여 웰빙 시대에 적합한 고품질의 녹차가 유통될 수 있게 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

유럽의 최대학술잡지사인 Elsevier가 주축이 되어 운영되고 있는 논문 검색 사이트인 ScienceDirect (www.sciencedirect.com)에서 'green tea(녹차)'를 주제로 검색하여 보면 2009년 4월 13일 현재 총 23,283편의 논문이 검색된다. 그 중에서 'green tea storage (녹차 저장)'으로 범위를 좁혀보면 4,252편의 논문이 검색된다. 한편, 미국 보건성(NIH)에서 운영하는 검색 사이트인 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)에서 운영하는 PubMed에서 'green tea(녹차)'를 주제로 검색하여 보면 3,240건의 논문이 검색되며, 'green tea storage (녹차 저장)'으로 범위를 좁혀보면 33편의 논문이 검색된다. 2008년과 2009년에만 5편의 논문이 발표되었는데, 이 중에서 3편의 내용을 보면 다음과 같다.

1. Friedman M, Levin CE, Lee SU, Kozukue N. Stability of green tea catechins in commercial tea leaves during storage for 6 months (상용 녹차를 6개월간 저장할 때의 녹차 카테킨의 안정성). *J. Food Sci.* 2009, 74(2), H47-51.

이 논문의 저자 소속은 미국 농무성(USDA)이다. 초록 내용은 다음과 같다. 녹차 생산자, 소비자의 요구를 돕기 위해 본 연구자들은 녹차의 건강 유용성분인 카테킨을 HPLC로 분석하였다. 녹차 시료는 미국, 한국, 일본의 티백이었으며, 이들을 20°C에서 저장하면서 1주, 1, 2, 4, 6개월째 샘플링하였다. 총 카테킨은 36.5-169.7 mg/g 녹차잎이었으며, EGCG는 13.3-113.0 mg/g 녹차잎이었다. 상기 결과를 각각 통계처리한 결과 저장 시간에 경과함에 따라 EGCG와 ECG가 가장 급격히 감소하였다. 저장 중에 카테킨의 분해에 대한 가능한 기작과 녹차 소비자에 대한 결과의 중요성을 고찰한다.

2. Zhao W, Yang R, Wang M. Cold storage temperature following pulsed electric fields treatment to inactivate sublethally injured microorganisms and extend the shelf life of green tea infusions (녹차를 저온 저장 후 펄스 전기장 처리하면 미생물을 불활성화시키며 녹차의 유통 기한이 연장된다). *Int. J. Food Microbiol.* 2009, 129(2), :204-208.

이 논문은 중국 지양난대학의 교수가 발표하였다. 이 연구에서는 4, 25, 37°C에서 펄스 전기장 (PEF)을 처리(38.4 kV/cm for 200 micros)하여 녹차의 미생물학적 품질을 분석하였다. 유지가 가능한 것을 보고하였다. PEF 처리 직후에는 미생물이 관찰되지 않았다. 그러나, 25, 37°C에 저장한 경우에는 미생물이 회복되었다. 즉, 25°C에서 14일간 저장한 경우와 37°C에서 7일간 저장한 후 PEF 처리한 경우에는 호기성 미생물이 급증하였다. 그러나 4°C에서 180일간

저장해도 미생물 수는 1 log CFU/mL 이하로 유지되었다. 이러한 결과는 녹차에서의 일부 미생물 세포들이 PEF 처리에 의해 가치사 상태로 손상을 받으며 거의 죽었거나 적당히 손상받은 세포들이 생존 미생물로 발전할 수 있음을 의미한다. 본 연구에서 PEF 처리된 녹차를 4°C에서 여러 기간동안 방치하였다가 37°C로 다시 저장해 보았다. PEF 처리후 저온저장(4°C에서 7일간)하면 가치사 손상된 세포의 회복을 지연하거나 억제하는데 매우 효과적이었으며, 이로 인해 37°C에서 90일간 유통기한을 연장시킬 수 있었다.

3. Ortiz J, Ferruzzi MG, Taylor LS, Mauer LJ. Interaction of environmental moisture with powdered green tea formulations: effect on catechin chemical stability (분말 녹차에서 주위 습도와 관계: 카테킨의 화학적 안정성에 대한 영향). *J Agric Food Chem.* 2008, 56(11), 4068-4077.

이 연구는 미국 퍼듀대학의 식품과학과에서 발표한 내용이다. 녹차와 녹차 카테킨은 최종 제품에서 안정하여 건강유익성을 가져야 하지만 녹차의 가공, 저장 조건과 다른 성분들에 의해 영향을 받는다. 이 연구의 목적은 가상의 녹차 음료 건조물에서 저장시의 상대 습도 및 기타 성분들이 카테킨의 안정성에 미치는 영향을 조사하는 것이다. 녹차 분말 단독, 그리고 설탕, 구연산, 비타민 C 등을 혼합한 시료를 22°C의 건조상자에서 상대습도를 0-85%로 하여 3달간 저장하였다. 조성물의 상호 작용 그리고 상대습도는 카테킨의 분해를 유의성있게 촉진시켰다. 분말녹차에서의 총 카테킨 함량 및 개별 카테킨 량은 상대습도가 증가할수록 증가하였으며, 상대습도 58% 이상에서 구연산 존재 조건 그리고 상대습도 75% 이상에서 비타민 C 존재 조건에서 더욱 악화되었다. 구연산과 비타민 C가 동시에 존재하면 가장 많이 카테킨이 분해되었다. 상대습도가 43% 이하에서는 22°C에서 3달간 저장한 모든 녹차 시료에서 카테킨의 안정성이 유지되지만 케이킹이 발견되었다. 이상의 결과는 완성된 건조 녹차 조성물에서 첨가물이 카테킨의 안정성에 미치는 영향을 처음 규명한 것이며 안정성 상품을 만들기 위해 첨가물들이 미치는 영향을 심각하게 고려되어야 함을 시사한다.

이러한 연구는 녹차에 대한 저장 조건이 품질 유지에 매우 중요하며, 녹차의 주 생산지이며 연구지인 일본을 벗어나 세계적인 관심사가 되었음을 나타낸다. 우리의 녹차가 세계적으로 인정받기 위해서는 이러한 연구가 뒷받침되어야 한다.

최근의 Alzheimer's disease (AD) 연구는 amyloid β protein ($A\beta$)에 의한 뇌 세포 파괴, 그리고 이들 단백질의 구조, 생리작용, 뇌신경세포 내에서의 축적에 의한 아세틸콜린 (ACh)의 level 감소 등이 중심이 되고 있다. AD의 치료는 주로 환자의 증세를 가볍게 하고, 병의 진행속도를 지연시키는데 주안을 두고 있

다. AD 환자에서 보는 주 증세는 기억력, 인지능력, 학습능력의 감퇴에 있고, 이어서 감정 장애와 이상행동을 가져온다. 이 중에서 가장 보편적인 증세인 기억력과 인지능력 장애에 대한 증세를 가볍게 해주는 간접 치료가 유일한 치료법이 되었다.

AD 환자의 뇌에서는 basal fore brain 있는 mynert nucleus 신경세포가 대부분 죽어 있어서 synaps와 대뇌피질과의 연결이 퇴화되어 있다. 이들 신경세포는 신경전달 물질을 생산하는 cholinergic nerve cell인데, 그 사멸로 인해서 AD 환자 뇌에서는 ACh 생산량이 현저하게 감소되어 있다. 이러한 이유로 뇌에서의 ACh 농도를 높게 유지시키면 환자의 기억력, 인지능력이 크게 회복된다고 보고된 바 있다. 실제로 현재 각국에서 사용되고 있는 AD치료제는 이러한 ACh 분해효소 억제제 (AChEis)가 대부분이며 tacrine (Cogver)과 donepezil (Aricept) 등이 이에 속한다. 이밖에도 rivastigmin (Exelon), galatamine (Reminyl)등이 사용되고 있으며 머크, 바이엘 등의 제약회사가 이와 비슷한 의약품들을 시장에 내놓고 있다. 이들 대부분은 직접적인 치료법 이라기보다는 질환의 진행을 최소한 늦추는데 중점을 두고 있다.

Acetylcholine의 합성을 촉진시키기 위해서 그 전구체인 콜린, 레시틴 아세틸카니틴 등을 투여하는 임상실험이 여러 번 시도되었으나, 이들 물질이 blood-brain-barrier을 통과하지 못하고 그 효력이 단기간이라는 결점으로 현재는 주목을 받지 못하고 있다. 현재 AD 환자를 치료하는 데 사용되고 있는 대증요법을 종합해보면 아세틸콜린 보충 요법이 가장 효과적이며, 다른 치료약제는 별로 효능을 나타내지 못하고 있다. 앞으로 더욱 효율적인 방법을 개발하려면 acetyl cholinesterase (AChE) inhibitor 뿐만 아니라 acetylcholine synthesis activator, brain nerve cell protector와 같은 여러 가지 의약품들을 고려해 놓고, 여러 신경전달물질의 뇌 안에서의 증가를 가져오는 신규 소재를 개발할 필요가 있다.

산업적인 측면에서는 AD 치매 치료제 시장이 연평균 32.3%의 성장을 거듭, 오는 2006년에 이르면 순수한 AD 치료제 시장만도 그 규모가 24억 달러에 도달할 것이라고 전망하고 있고 AD를 포함한 전 세계 치매 관련 시장 규모는 대략 2,000억 달러 규모, 원화로는 260조원 (1달러=1,300원)에 이를 것으로 추산되는 등 고부가가치형 산업으로 시장 잠재력이 매우 크다.

제 7 장 참고문헌

- A.O.A.C. (2000) The scientific association dedicated to analytical excellence
Washington D.C. U.S.A., p.17-24
- Bae, S.K., Lee, Y.C. and Kim, H.W. (2001) The browning reaction and
inhibition of apple concentrated juice. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 30,
6-13
- Balasubramanian, S., Efimova, T. and Eckert, R.L. (2002) Green tea
polyphenol stimulates a Ras, MEKK1, MEK3, and p38 cascade to
increase activator protein 1 factor-dependent involucrin gene expression
in normal keratinocytes. J. Biol. Chem., 277, 1828-1836
- Behl, C. (1999) Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for
novel therapeutic approaches. Prog. Neurobiol., 57, 301-323
- Bendayan, M. (1984) Proein-A-gold electronmicroscopicimmunocytochemistry
:methods, applications and limitations. J. Elect. Microsc. Tech., 1, 243-270
- Blois, M.S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free
radical. Nature, 181, 1199-1200
- Cai, Y.J., Ma, L.P., Hou, L.F., Li, B.Z., Yang, L.Y. and Liu, Z.L. (2002) Antioxidant
effects of green tea polyphenols on free radical initiated peroxidation of rat liver
microsomes. Chemistry and physics of lipids 120, 109-117
- Cespy, V. and Williamson, G. (1994) A review of the health effects of green
tea catechins in in vivo animal models. J. Nutr., 134, 3431-3440
- Chen, H., Zhang, M., Qu, Z. and Xie, B. (2008) Antioxidant activities of different
fractions of polysaccharide conjugates from green tea(*Camellia Sinensis*). Food
Chem. 106, 559-563
- Choi, H.J., Lee, W.S., Hwang, S.J., Lee, I.J., Shin, D.H., Kim, H.Y. and Kim,
K.U. (2000) Changes in chemical compositions of green tea (*Camellia
sinensis* L.) under the different extraction conditions. Korean J. Life Sci.,
10, 202-209
- Choi, J.H., Kim, D.I., Park, S.H., Baek, S.J., Kim, N.J., Cho, W.K., Kim, K.J.
and Kim, H.S. (2004) Effects of pine needle ethyl acetate fraction on
acetylcholine(ACh) and its related enzymes in brain of rats. Korean J.
Nutr. 37, 95-99

- Choi, S.I., Lee, J.H. and Lee, S.R. (1994) Effect of green tea beverage on the removal of cadmium and lead by animal experiments. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26, 740–744
- Cho, Y.J., Ahn, B.J. and Choi, C. (1993) Inhibition effect of against angiotensin converting enzyme of flavan-3-ols isolated Korean green tea. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 25, 238–242
- Choi, O.J. and Choi, K.H. (2003) The physicochemical properties of Korean wild teas (Green tea, Semi-fermented tea, and Blank tea) according to degree of fermentation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 32, 356–362
- Choi, S.H., Lee, B.H. and Choi, H.D. (1992) Analysis of catechin contents in commercial green tea by HPLC. *J. Korean Sci Nutr.*, 21, 386–389
- Cho, Y.S., Jeong, C.H., Bae, Y.I. and Shim, K.H. (1998) Changes of physicochemical characteristics in green tea according to percolation conditions. *J. Inst. Agri. & Fishery Develop. Gyeongsang Nat'l. Univ.*, 17, 117–127
- Chung, F.L., Schwartz, J., Herzog, C.R. and Yang, Y.M. (2003) Tea and cancer prevention, Studies in animals and humans. *J. Nutr.* 133, 3268S–3274S
- Conney, A.H., Wang, Z.Y., Ho, C., Yang, C.S. and Huang, M. (1992) Inhibition effect green tea on tumor growth on mouse skin. In phenolic compounds in food and their effects on health II; Huang, M., Ho, C. and Lee, C.Y., Eds; ACS Symposium Series 507; American Chemical Society: Washington DC, p. 284–291
- David, L., Angelo, T. and Laurent, B. (2006) Effect of brewing temperature and duration on green tea catechin solubilization : Basis for production of EGC and EGCG-enriched fractions. *Separation and Purification Technol.*, 49, 1–9
- Deng, G., Su, J.H., Ivins, K.J., Houten, B.V. and Cotman, C.W. (1999) Bcl-2 facilitates recovery from DNA damage after oxidative stress. *Exp. Neurol.*, 159, 309–318
- Diplock, A.T. (1997) Will the good fairies please prove to us that vitamin E lessens human degenerative disease? *Free Radical Res.*, 27, 511–532
- Drosti, I. E., et al. (1997) Inhibition of carcinogenesis by tea: The evidence

- from experimental studies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 37, 761–770
- Eberhardt, M.V., Lee, C.Y. and Liu, R.H. (2000) Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 405, 903–904
- Elzaawely, A.A., Xuan, T.D. and Tawata, S. (2005) Antioxidant and antibacterial activities of *Rumex japonicus* HOUTT. aerial parts. *Biol. Pharm. Bull.*, 28, 2225–2230
- Feng, Q., Torii, Y., Uchida, K., Nakamura, Y., Hara, Y. and Osawa, T. (2002) Black tea polyphenols, theaflavins, prevent cellular DNA damage by inhibiting oxidative stress and suppressing cytochrome p450 1A1 in cell culture. *J. Agric. Food Chem.* 1, 213–220
- Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W. and Vandenabeele, P. (1999) More than one way to die: apoptosis and necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene.*, 18, 7719–7730
- Food Code. (2008) Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea.
- Francis, F.J. (1972) Colorimetry of liquids. *Food Technol.*, 26 : 39–48
- Fujita, Y., Tamane, T., Tanaka, M., Kuwata, K., Okuzumi, J., Takahashi, T., Fujiki, H. and Okuda, T. (1989) Inhibitory effect of (–)epigallocatechin gallate on carcinogenesis with N–ethyl–N–nitroguanidine in mouse duodenum. *Jpn. J. Cancer Res.*, 80, 503–508
- Graham, H.N. (1992) Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry. *Prev. Med.*, 21, 334–350
- Gutfinger, T. (1981) Polyphenols in olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58, 966–968
- Jang, J.H. and Surh, Y.J. (2003) Protective effect of resveratrol on β amyloid–induced oxidative PC12 cell death. *Free Radical Bio. Med.*, 34, 1100–1110
- Jeon, J.R. and Park, G.S. (1999) Korean green tea by Ku Jeon Ku Po's I. Analysis of general compositions and chemical compositions. *Korean J. Soc. Food Sci.*, 15, 95–101
- Jeong, D.H. and Kim, J.T. (1997) The science of tea. Daegwang Press, Seoul, Korea. p 87–92
- Ji, B.T., Chow, W.H., Hsing, A.W., McLaughlin, J.K., Dai, Q. and Gao, Y.T. (1997) Green tea consumption and the risk of pancreatic and colorectal

- cancers. *Int. J. Cancer*, 70, 255–258
- Jung, D.W., Nam, E.S. and Park, S.I. (2005) Effect of Green Tea Powder on Growth of Lactic Culture. *Korean J. Food & Nutr.*, 18, 325–333
- Ko, G.H., Lee, K.H., and Cho, S.H. (1995) A safety test on grapefruit seed extract. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 24, 690–694
- Graham, H.D. (1992) Modified prussian blue assay for total phenolic compound. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 801–805
- Hara, Y., Matsuzaki, T. and Suzuki, T. (1987) Angiotensin I converting enzyme inhibiting activity of tea components. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 61, 803–807
- Ha, M.H., Park, W.P., Lee, S.C., Choi, S.G., and Cho, S.H. (2006) Antimicrobial characteristic of *Prunus mume* extract. *Korean J. Food Preserv.*, 13, 198–203
- Heo, H.J., Cho, H.Y., Hong, B.S., Kim, H.K., Kim, E.K., Kim, B.K., Shin, D.H. (2001) protective effect of 4',5-dihydroxy-3',6,7-trimethoxyflavone from *Artemisia asiatica* against A induced oxidative stress in PC12 cells. *Amyloid* 8, 194–201
- Hodgson, J.M., Puddy, I.b., Burke, V., Beilin, L.J., Mori, T.A. and Chan, S.Y. (2002) Acute effects of ingestion of black tea on post prandial platelet aggregation in human subjects. *Br J. Nutr.*, 87, 141–145
- Hong, J.T., Lyu, S.L., Yun, Y.P., Lee, B.M. and Kim, B.Y. (2001) Effect of green tea extract on the focal and global ischemiz/reperfusion induced brain injury. *The 6th International symposium on green tea*. 6, 43–50
- Kang, S.T., Yoo, U.H., Nam, K.H., Kang, J.Y. and Oh, K.S. (2007) Antioxidative effects of green tea extract on the oxidation of Anchovy oil. *J. Agriculture & Life Science*. 41, 47–53
- Kapsokefalou, M., Zhu, L. and Milledr, D.D. (2006) Adding iron to green tea may decrease its antioxidant capacity in rats after an oral dose of the mixture. *Nutrition research* 26, 480–485
- Katiyar, S.K., Afaq, F., Azizuddin, K. and Mukhtar, H. (2001) Inhibition of UVB-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)epigallocatechin-3-gallate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 176, 110–117
- Kato, F.T. and Puck, T.T. (1971) Mutagenesis by carcinogenic nitroso

- compounds. *J. Cell. Physiol.*, 78, 139–144
- Kim, D.O., Jeong, S.W. and Lee, C.Y. (2003) Antioxidant capacity of phenolic phytochemical from various cultivars of plums. *Food Chem.* 81, 321–326
- Kim, J.I. and Row, K.H. 2001. Recovery of catechin compound from Korean green tea by solvent extraction and partition. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 16 : 442–445
- Kim, S.H., Han, D.S. and Park, J.D. (2004) Changes of some chemical compounds of Korean(Posong) green tea according to harvest periods. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 36, 542–546
- Kim, Y.S., Jung, Y.H., Chun, S.S. and Kim, M.N. (1988) The kinetics of non-enzymatic browning reaction in green tea during storage at different water activities and temperatures. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 17, 226–232
- Kirishnamurthi, K.K. (1993) Processings of international seminar on green tea. *Kor. Society of Food Sci. and Technol.* Seoul, Korea
- Ko, W.J., Ko, K.S., Kim, Y.D., Jeong, K.W., Lee, S.H. and Koh, J.S. (2006) Changes in functional constituents and stability of green tea beverage during different storing conditions. *Korean J. Food Preserv.*, 13, 421–426
- Koh, S.H., Kwon, H., Kim, K.S., Kim, J., Kim, M.H., Yu, H.J., Kim, M., Lee, K.W., Do, B.R., Jung, H.K., Yang, K.W., Appel, S.H. and Kim, S.H. (2004) Epigallocatechin gallate prevents oxidative-stress-induced death of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase (G93A) motoneuron cells by alteration of cell survival and death signals. *Toxicology*, 202, 213–225
- Lee, B.R., Koh, K.O. and Park, P.S. (2007) Antihyperglycemic effects of green tea extract on alloxan-induced diabetic and OLETF rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 36, 696–702
- Lee, J.Y., Hwang, W.I. and Lim, S.T. (2004) Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle roots. *J. Ethnopharmacol.* 93, 409–415
- Lee, K.J. (2008) Antioxidant activity analysis of catechin compounds in Korean green tea using HPLC on-line ABTS⁺ antioxidant screening system. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 23, 96–100
- Lee, K.W., Lee, H.J., Kang, K.S. and Lee, C.Y. (2002) Preventive effects of

- vitamin C on carcinogenesis. *Lancet.*, 359, 172
- Lee, M.G., Lee, S.W., Kim, S.S., Lee, S.H. and Oh, S.L. (1989) Changes in testing constituents(tannin, free sugar, total nitrogen) of green tea by leaching condition. *K. J. Dietary Culture* 4, 411–416
- Lee, S.C., Kim, S.Y., Jeong, S.M. and Park, J.H. (2006) Effect of far–infrared irradiation on catechins and nitrite scavenging activity of green tea. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 399–403
- Lee, S.H., Choi, K.S. and Choi, J. (2004) Changes of chemical components of tea due to plucking season during cultivation in greenhouse. *J. Kor. Tea Soc.*, 10, 63–73
- Lee, Y.J., Ahn, M.S. and Hong, K.H. (1998) A study on the content of general compounds, amino acid, Vitamins, catechins, alkaloids in green, oolong and black tea. *J. Food Hyg. Safety*, 13, 377–382
- Liang, Y.C., Lin–Shiau, S.Y., Chen, C.F. and Lin, J.K. (1998) Suppression of extracellular signals and cell proliferation through EGF receptor binding by (–)–epigallocatechin gallate in human A431 epidermoid carcinoma cells. *J. Cell. Biochem.*, 67, 55–65
- Lim, J.S. (2003) Studies on the treatment and prevention of dementia by green–tea extracts. *Tajeon College Master these* 12, 11–26
- Lin, Y.L., Juan, I.M., Chen, Y.I., Liang, Y.C. and Lin, J.K. (1996) Composition of polyphenols in fresh tea leaves and associations of their oxygen–radical–absorbing capacity with antiproliferative actions in fibroblast cells. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1387–1364
- Litchfield, J.J. and Wilcoxon, F.A. (1949) Simplified method of evaluating dose–effect experiments. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 96, 99
- Mandel, S.A., Avramovich–Tirosh, Y., Reznichenko, L., Zheng, H., Weinreb, O., Amit, T. and Youdim, M.B. (2005) Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection. Modulation of cell survival genes, iron–dependent oxidative stress and PKC signalling pathway. *Neurosignals*. 14, 46–60
- Maeda, S. and Nakagawa, M. (1977) General chemical and physical analyses on various kinds of green tea. *Tea Research J.* 545, 85–88
- Muramatsu, K., Fukuro, M. and Hara, Y. (1986) Effect of green tea

- catechins of plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. *J. Nutr. Sci. Vitam. 32*, 613–615
- Masak, H., Stsumi, T. and Sakurai, H. (1995) Detection of hydrogen peroxide radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 206, 474–479
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in molecular biology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., p.352–355.
- Mukhtar, H. et al. (1999) Green tea chemoprevention of cancer. *Toxicol. Sci.*, 52, 111–117
- Mok, C.K. (2002) Suppression of browning of green tea by extraction with organic acids. *Food Engineering Process.* 6, 215–221
- Morre, D.M. and Morre, D.J. (2006) Anticancer activity of grape and grape skin extracts alone and combined with green tea infusions. *Cancer letters* 238, 202–209
- Nagle, D.G., Ferreira, D. and Zhou, Y.D. (2006) Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry*, 67, 1849–1855
- Nakagawa, M. et al. (1975) Difference in amino acid, tannin, total nitrogen contents in levels of cultivated species of green tea. *Bull. Japan Tea-Technician's Assoc.*, 48, 84–95
- Nijdam, J.J., Langrish, T.A.G. (2006) The effect of surface composition on the functional properties of milk powder. *Journal of Food Engineering*, 77, 919–925
- Nishi, H., et al., (1989) *J. Chromat.* 465, 331–334
- Oyaizu, M. (1986) Studies on products of browning reaction—antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucoamine. *Japanese J. of Nutr.*, 44, 307–315
- Park, C.S. (2005) Component and quality characteristics of powdered green tea cultivated in Hwagae area. *J. Food Preserv.*, 12, 36–42
- Park, J.H., Back, C.N. and Choi, H.K. (2005) Change in chemical components of powdered green tea during storage period at room temperature. *J. Kor. Tea Soc.*, 11, 75–84
- Park, J.H., Back, C.N. and Kim, J.K. (2005) Recommendation of packing

- method to delay the quality decline of green tea powder stored at room temperature. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.*, 23, 499–506
- Park, M.J., Jeon, Y.S. and Han, J.S. (2001) Fermentation characteristics of mustard leaf kimchi added green tea and pumpkin powder. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, 30, 215–221
- Park, S.H. (1991) *Modern experimental design*. Minyongsa. Seoul
- Park, U.Y., Chang, D.S. and Cho, H.R. (1992) Screening of Antimicrobial Activity for Medicinal Herb Extracts. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 21, 91–96
- Peng, G., Wargovich, M.J. and Dixon, D.A. (2006) Anti-proliferative effects of green tea polyphenol EGCG on Ha-Ras-induced transformation of intestinal cells. *Cancer Lett.*, 238, 260–270
- Price, M.L., Scoyoc, S.V. and Butler, L.G. (1978) A critical evaluation of the vanillin reaction as assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.*, 26, 252–259
- Piddock, L.J.V. (1990) Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 68, 307–310
- Pilar Almajano, M., Rosa Carbó, Angel López Jiménez J., Gordon, M.H. (2008) Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chem.* 108, 55–63
- Rhi, J.W. and Shin, H.S. (1993) Antioxidant effect of aqueous extract obtained from green tea. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 25, 759–763
- Runyons, C.R., Schmitt, F.A., Caban-Holt, A., Kryscio, R.J., Mendiondo, M.S. and Markesbery, W.R. (2005) Antioxidants for the prevention of dementia: overview of the pre-advise trial. *Alzheimer's Dementia* 1, 74
- Ryu, B.H. and Park, C.O. (1997) Antioxidant effect of green tea extracts on enzymatic activities of hairless mice skin induce by ultraviolet B light. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29, 355–361
- Sabu, M.C., Smitha, K., and Ramadasan, K. (2002) Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *J. Ethnopharmacology* 83, 109–116
- Sachinidis, A., Seul, C., Seewald, S., Ahn, H.Y., Ko, Y. and Vetter, H. (2000) Green tea compounds inhibit tyrosine phosphorylation of PDGF β

- receptor and transformation of A172 human glioblastoma. *FEBS Lett.*, 471, 51–55
- Satoh, I., Sakai, N., Enokido, Y., Uchiyama, Y. and Hatanaka, H. (1996) Free radical independent protection by nerve growth factor and Bcl-2 of PC12 cells from hydrogen peroxide triggered–apoptosis. *J. Biochem.*, 120, 540–546
- SAS (1997) SAS/STAT Software for PC. SAS Institute Inc., Cary, NC, U.S.A.
- Serafini, M., Ghiselli, A. and Ferro–Luzz, A. (1996) In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 50, 28–32
- Shibata, K., et al. (2000) Green tea consumption and chronic atrophic gastritis: a cross sectional study in green tea protection village. *J. Epidemiol.*, 10, 310–316
- Shin, M.K., et al. (1995) Chemical properties on the quality of marketed roasting green teas. *K. J. Soc. Food Sci.*, 11, 356–361
- Shiral, T., Reshad, K., Yoshitomi, A., Chida, K., Nakamura, H. and Taniguchi, M. (2003) Green tea–induced asthma: relationship between immunological reactivity, specific and non–specific bronchial responsiveness. *Clin. Exp. Allergy*. 33, 1252–1255
- Sikic, B.I., Mimnaugh, E.G., Litterst, C.L. and Gram, T.E. (1977) The effects of ascorbic acid deficiency and repletion on pulmonary, renal and hepatic drug metabolism in the guinea pig. *Arch. Biochem. Biophys.*, 179, 663–671
- Shon, M.Y., Kim, S.H., Nam, S.H., Park, S.K. and Sung, N.J. (2004) Antioxidant activity of Korean green and fermented tea extracts. *J. Life Science*. 14, 920–924
- Somers, T.C. and Evans, M.E. (1974) Wine quality–correlations with color density anthocyan equilibria in group of young red wine. *J. Sci. Food Agric.*, 25, 1369–1379
- Su, Y.L., Leung, L.K., Huang, Y. and Chen, Z.Y. (2003) Stability of tea theaflavins and catechins. *Food Chemistry*. 83, 189–195
- Wang, H., Cao, G. and Prior, R.L. (1996) Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 701–705

- Wang, H. and Helliwell, K. (2001) Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography. *Food Research International*. 34, 223–227
- Wang, H. and Helliwell, K. (2000) Epimerisation of catechins in green tea infusions. *Food Chemistry*. 70, 337–344
- Wang, H., Provan, G.J. and Helliwell, K. (2003) HPLC determination of catechins in tea leaves and tea extracts using relative response factors. *Food Chem.*, 81, 307–312
- Wang, L.F., Kim, D.M. and Lee, C.Y. (2000) Effect of heat processing and storage on flavanols and sensory qualities of green tea beverage. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4227–4232
- Wee, J.H. and Park, K.H. (1997) Retardation of kimchi fermentation and growth inhibition of related microorganism by tea catechins. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 29, 1275–1280
- Williams, R.J., Spencer, J.P. and Rice-Evans, C. (2004) Flavonoids: antioxidants or signalling molecules. *Free Radic. Biol. Med.*, 36, 838–849
- Wolfram, S. (2007) Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health. *J. Am. Coll. Nutr.*, 26, 373S–388S
- Yamamoto, T., Juneja, L.K., Chu, D.C. and Kim, M. (1997) Chemistry and applications of green tea. CRC Press, Boca Roton, NY, USA
- Yeo, S.G., Ahn, C.W., Kim, J.S., Park, Y.B., Park, Y.H. and Kim, S.B. (1995) Antimicrobial effect of tea extracts from green tea, olong tea and black tea. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 24, 293–298
- Youn, K.S. (2004) Absorption characteristics of green tea powder as influenced by particle size. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 33, 1720–1725
- Zhang, A., Zhu, Q.Y., Luk, Y.S., Fung, K.P. and Chen, Z.Y. (1997) Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of blood cells. *Life Sci.*, 61, 384–394

주 의

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