

보안과제(), 일반과제(○) 과제번호 : 106005-3

장군차의 항당뇨효과 규명 및 혈당조절용 제품의 개발
(Elucidation of Anti-diabetic Effect of *Jangguncha* and Development of Food Products Containing *Jangguncha* with Hypoglycemic Effect)

장군차의 혈당조절효과 규명 및 임상적용 (제1세부과제)
(Elucidation of hypoglycemic effect of *Jangguncha* and clinical applications)

장군차의 유효활성 성분 규명 및 항당뇨제품 개발 (제2세부과제)
(Determination of bioactive compounds from *Jangguncha* and development of anti-diabetic food products using *Jangguncha*)

장군차의 당뇨병성 신증 개선효과 및 작용 메커니즘 규명 (협동과제)
(Elucidation of beneficial effect of *Jangguncha* on diabetic nephropathy and underlying mechanism)

인제대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “장군차의 항당뇨효과 규명 및 혈당조절용 제품의 개발”과제(제1세부과제 “장군차의 혈당조절효과 규명 및 임상적용”, 제2세부과제 “장군차의 유효활성 성분 규명 및 항당뇨제품 개발”, 협동과제 “장군차의 당뇨병성 신증 개선효과 및 작용 메커니즘 규명”)의 보고서로 제출합니다.

2009년 4월 24일

주관연구기관명 : 인제대학교

주관연구책임자 : 김 정 인

세부연구책임자 : 김 묘 정

연 구 원 : 김미은 송지현

서영주 권정연

박지영 최지나

박용현 강민용

서수연 김창수

정용대 박순철

정병창

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 김 현 회

참 여 기 업 명 : 김해장군차영농조합법인

요 약 문

I. 제 목

장군차의 항당뇨효과 규명 및 혈당조절용 제품의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

장군차의 혈당조절효과 및 신장 합병증 개선효과를 규명하고 그 활성 성분을 분리·동정하며, 장군차를 이용한 혈당조절용 가공식품을 생산하여 부가가치를 높임과 동시에 지역 특산품으로서의 홍보를 극대화하고자 함

2. 연구의 필요성

가. 장군차 연구의 필요성

- (1) 김해지역에 자생하는 녹차는 장군차라 하여 다른 지방의 차나무와 유전형질적인 차이 점을 보이고 있지만 이에 대한 체계적인 연구는 거의 전무한 상태임.
- (2) 녹차의 생리활성에 관한 연구결과는 다수 보고되고 있으며 특히, 중국소엽종에 대한 연구가 많이 보고되고 있음.
- (3) 장군차의 생리활성에 대한 연구보고는 전혀 없는 상태이며 장군차의 혈당저하 활성 및 당뇨병성 신증 개선효과에 대한 연구 역시 전무한 상태임. 장군차의 맛과 향에 관한 기본적인 성분 분석은 보고되었으나 catechin과 같은 폴리페놀류의 성분분석에 대한 연구는 이루어지지 않았음.
- (4) 장군차는 녹차(우전, 세작, 중작)과 황차의 형태로 생산되고 있음. 한국, 일본 등지의 대부분의 차제품은 녹차로 시판되고 있으며, catechin 함량이 가장 높은 형태이고, 발효차인 황차는 catechin 함량이 50-60% 정도 감소된 상태임. 차의 생리활성에 대한 연구는 녹차제품에 집중되어 있으며 오롱차와 홍차에 대한 연구가 소수 있으나 황차에 대한 연구는 거의 없는 실정임. 장군차는 녹차 형태 외에 황차 형태의 경우에도 맛이 우수하여 기호성이 높은 것으로 알려져 있음.
- (5) 김해시와 주변지역의 많은 농가에 있어서 고소득 작물을 재배하고자 하는 의사가 강하나 아직 고소득 작물이 선정되어 있지 않은 상태임. 만약 장군차의 생리활성이 입증되

고 고부가가치 상품이 개발된다면 많은 농가에서 장군차 재배에 집중할 수 있으며, 농가 소득 증대에 기여할 수 있을 것임.

- (6) 따라서 장군차의 생리활성을 구체적으로 규명하고 활성물질을 분리하는 연구를 통해 그 기능성을 차별화할 필요성이 있다고 사료됨.

나. 당뇨병의 심각성 및 당뇨병 연구의 필요성

- (1) 당뇨병은 우리나라에서 최근 10년간 가장 급증한 만성퇴행성질환으로 국민의 삶의 질을 저하시키고 의료비 지출의 주요 요인이 되고 있음. 우리나라 국민의 사망요인 중 5위를 차지하고 있으며, 전 세계적으로 당뇨병은 사망요인 중 10위 이내에 해당됨.
- (2) 당뇨병은 현재 완치법이 확립되어 있지 않은 질환으로 당뇨환자 치료에 있어서 가장 중요한 목표는 혈당 조절임. 고혈당은 당뇨병 증세를 악화시키고, 당뇨환자의 주된 사망요인인 당뇨합병증을 일으키는 주된 요인임. 따라서 혈당조절효과가 우수한 소재는 당뇨병을 효과적으로 치료할 수 있음.
- (3) 현재 당뇨병 치료에 사용되고 있는 경구 혈당강하제는 저혈당, 복통, 심장 손상 등 여러 가지 부작용을 수반하고 있어 부작용이 없는 천연물 유래 혈당강하제를 개발할 필요성이 절실함.
- (4) 당뇨병 치료제 시장은 꾸준한 증가추세를 나타내고 있으나 대부분 원료 또는 완제품을 수입하고 있어, 외화유출이 심각하여 이를 대체할 수 있는 연구개발이 필요함. 국내에서 효능이 입증된 혈당 조절용 건강기능 제품의 개발은 경제성이 높을 것임.
- (6) 따라서 장군차로부터 경제성이 큰 고부가가치 상품을 개발하면 수입대체 효과를 기대할 수 있음

다. 당뇨병성 신증 개선 연구의 필요성

- (1) 과도한 free radical의 생성은 생체조직을 공격하여 세포를 손상시키는 원인이 됨. 당뇨병 환자는 체내 과산화물 생성 증가, 항산화효소 활성 저하 등으로 당뇨합병증 발병위험이 높음.
- (2) 대부분의 당뇨환자는 심혈관계합병증, 당뇨병성 신증을 포함한 합병증으로 사망하고 있어, 합병증의 예방과 지연은 치료의 주요목표임.
- (3) 당뇨병성 신증은 end-stage renal disease (ESRD)의 제1 주요 원인이며, 투석환자의 40% 이상이 당뇨환자임. 당뇨병성 신증은 방치하면 투석 또는 신장이식을 해야 하므로 당뇨환자의 삶의 질 저하에 지대한 영향을 미침.
- (4) 당뇨병성 신장합병증 발생을 줄이기 위해서는 혈당조절이 우선되어야 함. 고혈당은 oxidative stress를 유발하고 신장세포의 apoptosis를 유도하여, 당뇨병성 신증을 유발할 수 있음.
- (5) Dyslipidemia와 고혈압의 조절은 당뇨병성 신증을 포함한 당뇨 합병증의 예방과 치료에 있어서 중요한 요인임.
- (6) 따라서 장군차의 혈당 및 dyslipidemia 개선효과와 diabetic nephropathy 개선 메커니즘을 규명하여 경쟁력 있는 제품으로 개발할 필요성이 절실함.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 장군차의 혈당조절효과 규명 및 임상적용 [제1세부과제]

가. 식후 혈당조절효과 및 포도당 수송 개선효과 규명

- (1) *In vitro*에서 탄수화물 소화효소 저해활성 측정
 - 장군차 우전, 세작, 황차, 생잎 및 시판 녹차 추출물의 α -glucosidase 및 α -amylase 저해활성을 측정하였음
- (2) Streptozotocin 유발 당뇨쥐에 있어서 식후혈당 저하 효과 측정
 - 전분 투여 후 장군차의 식후혈당 조절효과를 측정하였음
 - 시간별 혈당증가치 및 혈당증가곡선의 면적을 비교하였음
- (3) 세포모델계에 있어서 말초조직의 포도당 수송(glucose transport) 개선 효과 측정
 - 3T3-L1 세포를 사용하여 장군차 우전 및 세작, 황차, 생잎, 녹차 추출물이 glucose uptake에 미치는 영향을 조사하였음

나. 당뇨동물 모델에 있어서 장군차의 당뇨병 개선효과 규명

- (1) 제2형 당뇨동물모델에서 장군차의 당뇨병 치료효과 및 합병증 개선효과를 규명하였음
- (2) 4주령의 db/db mouse에게 6주간 장군차 세작, 황차, 생잎을 공급하였음
- (3) 공복 혈당, 당화헤모글로빈 농도, 혈액 지질 profile을 측정하였음
- (4) 소장 탄수화물 소화효소 활성을 측정하였음
- (5) 간조직의 glucose transporter (GLUT4) 발현수준을 조사하였음
- (6) 간조직의 지질과산화물, 항산화효소계 활성을 측정하였음

다. 마우스에 있어서 장군차의 단기 안전성 확인

- (1) 생후 5주령의 수컷 및 암컷 마우스에게 장군차 추출물을 각각 0.25, 0.5, 1 및 2 g/kg 씩 1일 1회, 7일간 경구 투여하였음
- (2) 일반증상, 폐사의 관찰 및 부검: 투여 당일은 투여 후 1시간부터 6시간까지 관찰하였고 투여 다음날부터 7일까지는 1일 1회 일반 증상 및 중독 증상, 사망의 유무를 관찰하였으며, 희생시킨 후 각 장기의 소견을 관찰하였음
- (3) 백혈구, 적혈구, 헤모글로빈, hematocrit, BLP, MCV, MCH, mean MCHC, 총 단백질, LDH, GOT, GPT, BUN, creatinine, 혈당, 콜레스테롤, 중성지방 농도를 측정하였음

다. 제2형 당뇨환자에 있어서 장군차음료 시제품의 항당뇨효능 확인

- (1) 제2형 당뇨환자 20인을 두 군으로 나누어 실험군은 제2세부과제에 제공받은 장군차음료 시제품을, 대조군은 동일한 양의 placebo를 12주 동안 섭취시켰음

- (2) 시험기간 전, 후에 신체계측을 실시하였음 : 체중, 체질량 지수(BMI), 체지방, 허리둘레를 측정하였음
- (3) 혈당조절효과 : 공복 혈당, 인슐린, 당화헤모글로빈을 측정하였고, HOMA-IR을 조사하였음
- (4) 지질대사 개선효과 : 중성지방, 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤을 측정하였음

2. 장군차의 유효활성 성분 규명 및 항당뇨제품 개발 [제2세부과제]

가. 장군차의 폴리페놀류 성분 분석

- (1) 장군차 폴리페놀류의 정량 분석방법 확립
 - Catechin 표준품을 기준으로 하여 HPLC를 이용한 catechin 및 카페인 정량 분석방법을 확립하였음
- (2) 장군차의 추출조건 결정
 - 장군차의 온도 및 추출시간에 따른 catechin 및 카페인 함량을 분석하였음
- (3) 장군차 제품별 및 생잎의 폴리페놀류 분석
 - 우전, 세작, 중작, 대작, 황차 및 생잎의 catechin을 분석하였음
- (4) 장군차 생잎의 크기 및 시기별 폴리페놀류 분석
 - 2007년 4월부터 12월까지 매월 크기에 따른 5종류의 잎을 채취한 후 catechin을 분석하였음
- (5) 산지별 녹차와 장군차의 폴리페놀류 분석
 - 보성녹차 및 하동녹차의 catechin을 분석하여 장군차와 비교하였음

나. 장군차의 유효활성성분의 정제 및 생리활성

- (1) 장군차 용매추출 및 계통분획
 - 장군차 세작으로부터 메탄올 추출물을 제조하였음
 - 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 등의 용매를 사용하여 메탄올 추출물을 계통분획하였음
- (2) 장군차 용매분획의 생리활성 측정
 - 항산화활성 : DPPH 라디칼 소거능 및 TEAC법으로 측정하였음
 - 알파글루코시다제 저해활성 : 효모에서 유래한 알파글루코시다제의 활성 저해도를 측정하였음
 - 타이로시나제 저해활성 : 미백효과를 확인하기 위하여 버섯 유래 타이로시나제 저해활성을 측정하였음
 - 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 정량 : 총 폴리페놀은 Folin-ciocalteau 방법으로, 총 플라보노이드는 Siddhrajju 방법으로 정량하였음
- (3) 장군차 활성분획의 주요 성분 분석
 - 생리활성이 가장 우수한 에틸아세테이트 분획의 폴리페놀류를 HPLC를 이용하여 분석하였음
 - 주성분의 하나인 EGCG의 알파글루코시다제 저해활성 메커니즘을 inhibition kinetics를 수행하여 분석하였음

다. 장군차의 활성성분이 포함된 음료의 개발

- (1) 장군차 유효활성성분의 안정성 평가
 - 장군차 증작 추출물의 가열공정(100℃, 30분)에서 catechin의 손실량을 측정하였음
 - 장군차 추출물에 ascorbic acid를 첨가하여 가열공정 시 catechin의 보호효과를 측정하였음
- (2) 장군차음료의 카페인 함량 감소를 위한 전처리 방법 평가
 - 2차 추출 : 장군차를 60℃에서 5분간 1차 추출한 후 다시 10분간 2차 추출하였음
 - 생잎의 열처리 : 제다공정을 거치기 전 수확된 생잎을 끓는 물에서 열처리 하였음
 - 추출액의 pH 조절 : 추출 시 ascorbic acid를 이용하여 pH를 4, 5, 6으로 조정하여 추출하였음
 - 효소 첨가 : 추출 시 Rapidase TF를 첨가하여 60℃에서 5분간 추출한 후 80℃에서 30분간 가열하여 효소반응을 정지시켰음
 - 이산화탄소 아임계 추출 : 장군차 증작을 이산화탄소 아임계 추출기를 이용하여 처리한 후 60℃에서 5분간 추출하였음
- (3) 장군차 유효활성성분의 추출조건 최적화
 - 장군차 증작을 이용하여 차잎 첨가량, 추출온도, 추출시간, 추출횟수, ascorbic acid 첨가량 등의 최적 추출조건을 확립하였음
- (4) 장군차음료의 시제품 개발
 - 최적 추출조건을 바탕으로 파우치 형태의 장군차음료 시제품을 제작하였으며 당뇨환자의 임상시험용으로 제공하였음
- (5) 기타 장군차 응용 제품의 개발
 - 장군차 추출액을 이용하여 다양한 식품에 적용할 수 있는 원료소재로 개발하기 위하여 장군차 추출 농축액 및 장군차 분말을 제조하였음
 - 장군차 추출 농축액 : 장군차 증작을 5% 첨가하여 60℃에서 60분간 추출한 후 여과하여 최종농도가 8.0%Brix가 될 때까지 진공농축하여 장군차 추출 농축액을 제조하였음
 - 장군차 분말 : 장군차 증작을 열풍건조한 후 분쇄기로 분쇄하여 장군차 분말을 제조하였음
 - 장군차 추출 농축액 및 장군차 분말을 이용하여 식빵, 쿠키, 국수 등의 다양한 식품에 적용하여 제품의 타당성을 검토하였음

3. 장군차의 당뇨병성 신증 개선효과 및 작용메커니즘 규명 [협동과제]

가. 장군차의 신장 보호효과 규명

- (1) 세포모델계에서 신장 보호효과 규명
 - 근위 신세뇨관세포에서 유래된 MDCK 세포모델계에서 신장보호효과를 조사하였음

- 신독성물질인 수산 나트륨을 첨가한 후, 장군차 추출물의 신세포손상 억제효과를 조사하였음
- (2) 흰쥐에 있어서 장군차 추출물이 신장손상에 미치는 영향 연구
 - SD계 흰쥐에게 gentamycin을 주사하여 신손상을 유도한 후 장군차 세차, 황차 및 생잎을 30일간 공급하였음
 - 신기능 조사 : 24시간 요량을 조사하였고, 뇨 creatinine 농도를 측정하였음
 - 신손상 정도 평가 : 24시간 요에서 GGT, NAG를 측정하였음

나. 제2형 당뇨동물모델에 있어서 당뇨병성 신증 개선효과 및 신장 보호효과 규명

- (1) 4주령의 db/db mouse에게 황차, 생잎을 식이에 첨가하여 14주간 공급하였음
- (2) 신기능 정도를 알기 위하여 24시간 요량, 혈액과 요의 creatinine 농도를 측정 후 24시간 creatinine 청소율을 계산하였음
- (3) 당뇨병성 신증 지표인 요중 microalbumin, 총 단백량을 측정하였음
- (4) 적출된 신장의 무게를 측정하고 신장의 사구체 조직을 전자 현미경으로 관찰하였음

다. 장군차 제품의 당뇨병성 신증 개선효과 규명

- (1) 제2형 당뇨동물 모델계에 있어서 장군차음료의 당뇨병성 신증 개선효과
 - Db/db mouse에게 제2세부과제에 제공받은 장군차음료를 14주간 제공하였음
 - 혈당을 측정하였고, 24시간 요량, 24시간 요중 creatinine clearance, albumin, Na를 측정하여 당뇨병성 신증 개선효과를 규명하였음
 - 신장 조직의 TBARS 함량 및 항산화효소계 활성을 측정하였음
- (2) 제2형 당뇨환자에 있어서 장군차음료의 신장 보호효과 확인
 - 제2형 당뇨환자 20인을 두 군으로 나누어 실험군은 장군차음료 시제품을, 대조군은 동일한 양의 placebo를 12주 동안 섭취시킴(제1세부과제와 연계하여 실시)
 - 시험기간 전·후의 소변의 Na, K 및 사구체여과율(GFR)을 조사하였음
 - 혈청의 Na, K, BUN, creatinine 농도를 측정하였음
 - 시험기간 전·후의 요중 albumin 농도 및 혈압을 측정하였음
 - 항산화 효과 : 혈청 TBARS 및 적혈구 SOD, catalase, GSH-px 활성을 측정하였음

라. 장군차의 당뇨병성 신증 개선 메커니즘 규명

- (1) MDCK cell에 sodium oxalate 및 장군차 중차 추출물(0, 10, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 가하고 배양한 후 MTT assay로 세포고사 억제정도를 측정하였음
- (2) MDCK cell에 있어서 장군차 활성성분의 항산화효과를 malondialdehyde(MDA) assay로 측정하였음

IV. 연구개발결과

1. 장균차의 혈당조절효과 규명 및 임상적용 [제1세부과제]

가. 식후 혈당조절효과 및 포도당 수송 개선효과 규명

(1) *In vitro*에서 탄수화물 소화효소 저해활성

- 장균차 및 녹차 메탄올 추출물의 yeast α -glucosidase 저해활성은 장균차 세작, 장균차 우전, 장균차 생잎, 시판 녹차, 장균차 황차 순으로 나타나, 당뇨병 치료제인 acarbose 보다 높게 나타났음
- 장균차 추출물 α -amylase 저해활성은 장균차 황차, 장균차 세작, 녹차, 장균차 우전, 장균차 생잎의 순으로 나타났음

(2) 동물모델계에 있어서 혈당 저하효과 규명

- 당뇨병에 있어서 전분과 함께 세작, 황차 및 생잎 추출물을 섭취시킨 경우, 식후 30, 60, 90, 180분에 혈당 증가치가 전분만 섭취한 경우에 비해 유의적으로 감소하였음
- 식후 혈당변화 곡선의 면적은 대조군에 비해 세작군, 황차군, 생잎군 모두 유의적으로 감소하였음

(3) 세포모델계에 있어서 포도당 수송 개선효과

장균차 우전, 세작, 황차 및 생잎, 녹차 추출물은 3T3-L1 cell에 있어서 glucose uptake를 개선시켰음

나. 제2형 당뇨병동물모델에서 장균차의 당뇨병 개선효과 규명

(1) 장균차 세작, 황차, 생잎의 장기간 섭취는 체중 감소효과를 나타내었음

(2) 혈당개선 효과

- 장균차 세작, 황차, 생잎의 장기간 섭취는 공복혈당과 당화헤모글로빈 농도를 유의적으로 감소시켰음

(2) 지질대사 개선효과

- 혈장 중성지방 및 총 콜레스테롤 농도는 세작군, 황차군, 생잎군에서 대조군에 비해 유의적으로 감소하였음

(3) 소장점막의 탄수화물 소화효소 활성

- 세작군, 황차군, 생잎군의 maltase 활성은 대조군에 비해 유의적으로 감소하였음

(4) 유전자 수준에서의 혈당조절 메커니즘 규명

- 세작군, 황차군, 생잎군의 간조직 GLUT4 mRNA expression이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였음

(5) 지질과산화물 및 항산화 효소계 활성

- 세작군, 황차군, 생잎군의 간조직 TBARS 함량은 대조군에 비해 유의적으로 감소하였음
- 간조직의 SOD 활성은 세작군, 황차군, 생잎군이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였음
- 세작군, 생잎군의 간조직 catalase 활성은 대조군에 비해 유의적으로 증가하였음

다. 마우스에 있어서 장군차의 단기 안전성 확인

- (1) ICR 마우스에게 장군차 추출물 0.25, 0.5, 1 및 2 g/kg을 7일간 투여한 결과, 투여로 인한 이상증상이 관찰되지 않았으며 사망한 동물은 없었음
- (2) 대조군 및 각 농도별 투여군의 체중, 간, 신장, 비장, 심장 조직 무게에 유의적인 차이가 없었음
- (3) 대조군 및 각 농도별 투여군의 백혈구, 적혈구, 헤모글로빈, hematocrit, blood platelet, MCV, MCH 및 MCHC 농도는 유의적인 차이가 없었음. 대조군 및 각 농도별 투여군의 혈액 중의 LDH, GOT, GPT 활성 및 혈당, 총 단백질, BUN, creatinine, 콜레스테롤 및 중성지방 농도는 유의적인 차이가 없었음

라. 제2형 당뇨병환자에 있어서 장군차음료 시제품의 항당뇨효능 확인

- (1) 대조군(n=10)과 장군차음료군(n=10) 모두 체중, 허리둘레, 체질량지수, 체지방이 12주간의 시험 기간 전, 후에 유의적으로 변화하지 않았음
- (2) 혈당개선효과 : 장군차군의 혈당은 장군차음료 시제품 섭취로 인해 유의적으로 감소하였고, 인슐린 및 당화헤모글로빈 농도는 유의적으로 변화하지 않았음. 장군차음료의 섭취는 HOMA-IR을 감소시켜 인슐린 저항성을 개선하였음
- (3) 지질대사 개선효과 : 장군차군의 혈청 총 cholesterol 농도는 장군차음료 시제품 섭취로 인해 유의적으로 감소하였으며, TG, HDL-cholesterol 및 LDL-cholesterol 농도는 유의적으로 변화하지 않았음

2. 장군차의 유효활성 성분 규명 및 항당뇨제품 개발 [제2세부과제]

가. 장군차의 폴리페놀류 성분 분석

- (1) 장군차 폴리페놀류의 정량 분석방법 확립
 - Catechin(EC, ECG, GCG, EGC, EGCG, C, GC, GA) 및 카페인의 HPLC 분석조건을 확립하였음. HPLC 조건으로 컬럼은 C₁₈, 용매는 0.05% TFA가 첨가된 물(A용매)과 0.05% TFA가 첨가된 아세토니트릴(B용매), 농도구배는 50분간 0-25%의 B용매가 되도록 하였음
- (2) 장군차의 추출조건 결정
 - 장군차의 catechin 함량분석을 위하여 장군차 분말을 80°C에서 15분간 추출하였을 경우 가장 많은 catechin이 용출되는 것을 확인하였음
- (3) 장군차 제품별 및 생잎의 폴리페놀류 분석
 - 장군차 우전이 1 g당 124mg의 총 catechin을 함유하였으며 세작, 중작, 대작의 총 catechin 양은 유사하였으나 EGCG의 양은 우전>세작>중작>대작의 순으로 많았음. 황차에는 catechin이 아주 소량 함유되어 있었으며 제다가공 전 생잎의 catechin은 우전보다 높았음

(4) 장군차 생잎의 크기 및 시기별 폴리페놀류 분석

- 장군차 생잎에 함유된 catechin의 함량은 6월-9월에서 가장 높게 나타났으며, 잎의 크기가 작고 어릴수록 함량이 높게 나타났음
- 따라서, 잎차로서 장군차의 수확이 끝난 후 여름철에 장군차 잎을 활용한다면 catechin의 함량이 높은 장군차 추출물 제조가 가능할 것으로 판단됨

(5) 산지별 녹차와 장군차의 폴리페놀류 분석

- 보성녹차 및 하동녹차의 catechin 함량은 제품에 따라 다소 차이가 있지만 전반적으로 장군차와 큰 차이는 없었음
- 장군차와 보성녹차가 하동녹차에 비하여 EGCG를 비롯한 총 catechin함량이 다소 높은 것으로 확인되었음

나. 장군차의 유효활성성분의 정제 및 생리활성

(1) 장군차 용매추출 및 계통분획

- 장군차 세작으로부터 메탄올 추출물을 제조하였으며 수율은 25.2%였음
- 각 용매별로 계통분획을 실시하여 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 수용액 분획을 얻었으며 수율은 각각 42.4, 21.9, 13.1, 8.0, 5.0%로 헥산분획의 양이 가장 많았음

(2) 장군차 용매분획의 생리활성 측정

- 항산화활성 : DPPH 라디칼 소거능의 경우 에틸아세테이트 분획이 IC₅₀값이 3.96 μ g/mL로 가장 우수하였으며 대조군인 ascorbic acid와 유사하였음. TEAC 결과도 에틸아세테이트 분획이 1.59mM TE로 가장 우수하였음
- 알파글루코시다제 저해활성 : 에틸아세테이트 분획의 알파글루코시다제 저해활성이 가장 우수하였고 IC₅₀값이 5.27 μ g/mL로 대조군인 acarbose에 비하여 월등히 우수하였음
- 타이로시나제 저해활성 : 에틸아세테이트 분획의 타이로시나제 저해활성이 가장 우수하였으나 IC₅₀값이 39.5 μ g/mL로 대조군인 hydroquinone의 5.5 μ g/mL보다 상대적으로 약하였음
- 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 정량 : 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드의 함량은 에틸아세테이트 분획이 가장 높았으며 각각 25.3% 및 3.6%였음

(3) 장군차 활성분획의 주요 성분 분석

- 생리활성이 가장 우수한 에틸아세테이트 분획의 주요 활성성분은 catechin인 것으로 확인하였으며 그 중 EGCG의 양이 가장 많았음
- 주성분의 하나인 EGCG의 알파글루코시다제 저해활성은 경쟁적 저해 메커니즘을 따르는 것으로 확인되었으며 K_i값이 4.94nM로 상당히 우수한 것으로 확인되었음

다. 장군차의 활성성분이 포함된 음료의 개발

(1) 장군차 유효활성성분의 안정성 평가

- 장군차 증착 추출물을 열처리(100 $^{\circ}$ C, 30분)할 경우 총 catechin의 30%가 파괴되는 것으로 확인되었음
- 장군차 추출물에 ascorbic acid를 첨가할 경우 농도의존적으로 catechin의 파괴를 억제하

- 며 1.0mg/mL 이상의 농도에서 열처리에 의한 catechin의 손실이 거의 없었음
- 그러나 ascorbic acid를 1.0mg/mL 이상 첨가할 경우 pH가 5.0 이하로 감소하고 신맛이 강하여 제품에 응용하기에는 적절치 않았음

(2) 장군차음료의 카페인 함량 감소를 위한 전처리 방법 평가

- 2차 추출 : 장군차를 60°C에서 2차 추출한 결과 1차 추출액에 비하여 약 5%의 카페인이 감소하여 큰 효과는 없었음
- 생잎의 열처리 : 제다공정을 거치기 전 수확된 생잎을 끓는 물에서 1-5분간 열처리한 결과 약 40-50%의 카페인이 감소되어 다른 처리군에 비하여 감소폭이 가장 컸음. 향후 열처리한 생잎으로 제다공정을 진행할 경우 카페인 함량을 크게 낮출 수 있을 것으로 판단됨
- 추출액의 pH 조절 : 추출 시 ascorbic acid를 이용하여 pH를 낮춘 후 추출하였을 경우 약 30% 내외의 catechin 함량을 감소시킬 수 있었으나 추출되는 카페인의 양이 감소되기 보다는 catechin의 양이 증가하기 때문이었으며 pH 저하로 인한 신맛으로 인하여 현장 적용에 어려움이 있는 것으로 판단됨
- 효소 첨가 : 추출 시 차잎의 세포벽을 파괴하여 추출효율을 높일 수 있는 Rapidase TF를 첨가한 결과 총 catechin 뿐만 아니라 카페인의 추출량도 함께 증가하여 카페인의 감소 효과는 없었음
- 이산화탄소 아임계 추출 : 장군차 증작을 액체 이산화탄소로 처리한 결과 10-20% 정도의 카페인 함량 감소효과를 얻을 수 있었으나 catechin과 카페인 추출량이 모두 증가하였고 대량 생산공정에 적합하지 않아 현장에 적용하기에 적절하지 않았음

(3) 장군차 유효활성성분의 추출조건 최적화

- 장군차음료를 개발하기 위한 최적 추출조건은 200mL 당 증작 3g을 60°C에서 5분간 1차 추출한 후 다시 10분간 2차 추출하여 제조하는 것으로 이 때 산화방지 효과와 catechin 성분의 보호효과를 위하여 0.02%의 ascorbic acid를 첨가하는 것으로 결정하였음.

(4) 장군차음료의 시제품 개발

- 장군차 증작을 이용하여 추출액을 제조한 후 파우치에 포장하고 105°C에서 15분간 살균하여 시제품을 제작하였으며 당뇨환자의 임상 실험용으로 제공하였음

(5) 기타 장군차 응용 제품의 개발

- 장군차 추출액을 이용하여 다양한 식품에 적용할 수 있는 원료소재로 개발하기 위하여 장군차 추출 농축액 및 장군차 분말을 제조한 후 식빵, 쿠키, 국수 등의 다양한 식품에 적용하여 제품의 타당성을 검토하였음

3. 장군차의 당뇨병성 신증 개선효과 및 작용 메커니즘 규명 [협동과제]

가. 장군차의 신장 보호효과 규명

(1) 세포모델계에 있어서 장군차의 신세포보호효과 규명

- 장군차 우전 및 세작 추출물(250 µg/mL 이하)의 MDCK 세포주에 대한 세포 독성 효

과는 없었음

- 신독성물질을 첨가한 후 장군차 세작추출물(10, 25, 50 μM)의 신세포손상 억제효과를 검사한 결과 control 대비 세포 생존율은 87% 이상으로 나타났음
- (2) 신장병 동물모델계에 있어서 장군차 추출물이 신장손상에 미치는 영향
- 각 군당 24시간 요량은 차이가 없었음. 신손상군의 24시간 요 크레아티닌이 정상대조군에 비해 유의하게 감소하였으며 신손상군에서 세작과 황차, 생잎을 투여하였을 때 요 크레아티닌 수치가 상승하였음
 - 신손상군의 24시간 GGT, NAG가 정상대조군에 비해 현저하게 상승하였으며, 세작과 황차, 생잎을 투여하였을 때 GGT, NAG가 유의하게 감소하여 장군차가 신손상억제효과가 있음을 확인하였음

나. 장군차의 당뇨병성 신증 개선효과 규명

- (1) Db/db mouse에 있어서 대조군, 황차군, 생잎군의 24시간 요량은 유의적 차이가 없었으며 24시간 creatinine 청소율은 생잎군이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였음
- (2) 24시간 microalbumin 수치 및 총 단백질량은 황차군 및 생잎군이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였음. 따라서 장군차 황차 및 생잎은 당뇨병성 신증에 의한 hyperalbuminuria를 감소시켜 당뇨병성 신증 개선 효과가 있는 것으로 사료됨
- (3) 황차군 및 생잎군의 평균 신장 무게는 대조군에 비해 유의적으로 감소하여, 당뇨병성 신증에 의한 신비대를 개선시키는 효과가 있는 것으로 나타났음
- (4) 신장 조직 검사 : 대조군의 glomerular basement membrane에서 조직학적 특징인 foot process가 소실된 상태였으나, 황차군과 생잎군의 경우 foot process가 관찰되어 당뇨에 의한 사구체 조직의 변성을 예방하는 효과가 있는 것으로 사료됨

다. 장군차 제품의 당뇨병성 신증 개선효과 및 메커니즘

- (1) 제2형 당뇨동물 모델계에 있어서 장군차음료의 당뇨병성 신증 개선효과
- 장군차음료군의 혈당이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였음
 - 24시간 뇨량은 장군차군에서 3배 이상 증가하였음
 - 요중 creatinine clearance 및 Na 수치는 장군차군에서 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며 albumin 수치는 장군차군에서 대조군에 비해 유의적으로 감소하여, 장군차음료의 당뇨병성 신증 개선 효과가 나타났음
 - 신장 조직의 TBARS 함량이 감소하고, catalase 활성이 증가하여 항산화효과를 나타내었음
- (2) 제2형 당뇨환자에 있어서 장군차음료의 신장 보호 효과
- 제2형 당뇨환자에 있어서 장군차음료의 12주간 섭취는 요중 albumin 배설량 및 GFR에 유의적인 영향을 주지 않았음
 - 장군차음료의 섭취는 혈장 Na, K, BUN, creatinine 농도, 요중 Na, K에는 유의적인 영향을 주지 않았음
 - 장군차군의 최고혈압 및 최저혈압은 대조군에 비해 시험기간 후 유의적으로 감소하여

신장 보호효과가 기대됨

- 항산화 효과 : 장군차군의 혈중 TBARS 농도는 장군차음료 시제품 섭취로 인해 유의적으로 감소하였으며, 적혈구 catalase 활성이 유의적으로 증가하여 신장 보호효과가 기대됨. SOD 및 GSH-px 활성은 유의적으로 변화하지 않았음

라. 장군차의 당뇨병성 신증 개선 메커니즘 규명

- (1) MDCK 세포주에 있어서 sodium oxalate 단독처리에 비하여 장군차 추출물은 세포고사 억제 효과를 나타내었음
- (2) 대조구에서는 MDA 생성이 시간이 경과함에 따라 증가하였으나, 장군차군에서는 시간이 경과함에 따라 MDA 생성이 감소하여, 항산화효과를 나타내었음. 따라서 장군차의 항산화활성이 당뇨병성 신증 개선효과에 기여하는 것으로 사료됨

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

- 가. 본 연구에서 얻은 결과를 12건의 학술대회발표를 통하여 대외적으로 홍보하였으며, 1건의 SCI급 논문과 1건의 비SCI급 논문을 투고 중임
- 나. 본 연구결과를 바탕으로 국내 특허를 2건 출원하고, 1건 등록하여 특허권을 확보하였음
- 다. 등록된 특허 1건에 대해 김해장군차영농조합법인에 기술이전을 실시하였음
- 라. 체계적인 연구가 거의 전무한 장군차의 항당뇨 효과 및 당뇨병성 신증 개선효과를 규명하였고 활성성분의 분석을 통하여 장군차 데이터베이스의 기초 자료를 제공하였음
- 마. 장군차를 베이스로 한 항당뇨, 신장보호 기능성 제품 개발의 기초자료를 제공하여 고부가가치 제품의 개발에 응용할 수 있는 계기를 마련하였음
- 바. 장군차 잎의 크기별, 시기별 catechin 함량을 분석하여 차잎의 다양한 활용을 위한 기초 자료를 제공하였음
- 사. 장군차음료의 카페인함량을 감소시키기 위한 다양한 방법을 시도하여 이에 대한 산업화 적용가능성을 제시하였음
- 아. 당뇨병 치료 및 심혈관계 질환, 당뇨병성 신증 등의 당뇨합병증 예방효과가 우수한 소재를 개발하였음
- 자. 당뇨병 환자가 지속적으로 섭취할 수 있는 부작용 없고 값이 저렴한 혈당 조절 및 당뇨합병증 개선용 음료를 개발하였음

2. 성과활용 계획

- 가. 본 연구결과를 바탕으로 2건의 SCI급 논문과 1건의 비SCI급 논문을 추가로 발표할 계획임
- 나. 본 연구에서 규명한 장군차의 생리활성을 포함한 우수성에 관한 논문, 학회발표 및 광고 등을 통하여 대외적으로 홍보하여 장군차의 매출 증대에 기여할 계획임
- 다. 김해장군차영농협동조합에 기술이전을 실시하였으며 이를 바탕으로 혈당조절용 장군차음료를 개발, 판매하여 매출을 증대시킬 계획임
- 라. 소비자의 선호도가 높은 제품을 개발하고 대량생산 할 수 있도록 지속적인 기술지도를 수행할 계획임

SUMMARY

(영문요약문)

Diabetes mellitus is increasing in the general population. Diabetes is the fifth leading cause of death among Koreans. Controlling blood glucose and dyslipidemia are the major goals in the treatment of diabetes mellitus and prevention of diabetes-related complications including diabetic nephropathy. Diabetic nephropathy is one of the most fatal microvascular complications of diabetes mellitus. Because alterations of glomerular structure is irreversible, the essential point of management of diabetic nephropathy is to protect against the progression to the end stage renal disease. Green tea has been considered as promising agent for prevention and treatment of diabetes mainly due to catechin, the major compounds with strong antioxidant activity.

The objectives of this study are to elucidate protective effect of *Jangguncha*, *Camellia sinensis* var. *assamica* against diabetes and diabetic nephropathy and develop value-additive products with anti-diabetic effect. This project consists of three subjects to fulfill the objectives. The first subject is to elucidate hypoglycemic effect of *Jangguncha* *in vitro* and *in vivo*. The second is to identify the bioactive compounds with anti-diabetic activity from *Jangguncha* and develop functional food materials. The third is to determine protective effect of *Jangguncha* against diabetic nephropathy and underlying mechanisms.

1. Elucidation of hypoglycemic effect of *Jangguncha* and clinical applications

A. Hypoglycemic effect of *Jangguncha* *in vitro* and *in vivo*

- Inhibitory activities against carbohydrate digestion enzymes *in vitro*

Inhibitory activities of extracts of *Jangguncha* against yeast α -glucosidase were measured *in vitro*. Extracts of *Woojeon*, *Saejack*, *Hwangcha* and raw leaves showed strong inhibitory activities compared with acarbose.

- Inhibitory activities against postprandial hyperglycemia

Beneficial effect of *Jangguncha* extracts against postprandial hyperglycemia was measured in streptozotocin-induced diabetic rats using a carbohydrate load test. Oral administration of extracts of *Saejack*, *Hwangcha* and raw leaves significantly decreased the area under the glucose response curve(AUC) compared with that of the control group.

- Modification of glucose uptake in cell model

Effect of *Jangguncha* extracts on transport of 2-deoxy-D-[3 H]-glucose in 3T3-L1 cells was

measured. Extracts of *Woojeon*, *Saejack*, *Hwangcha* and raw leaves significantly increased glucose transport compared with the control.

B. Effect of chronic feeding of *Jangguncha* on glycemic control and lipid metabolism in db/db mice

- Db/db mice were fed AIN-93G diet or diet containing 5% *Saejack*, *Hwangcha* or raw leaves for 6 weeks. Consumption of *Saejack*, *Hwangcha* and raw leaves significantly decreased plasma glucose and glycated hemoglobin. Plasma cholesterol and triglycerides were significantly decreased by consumption of *Saejack*, *Hwangcha* and raw leaves

- Consumption of *Saejack*, *Hwangcha* and raw leaves significantly decreased hepatic TABRS and increased SOD activity. *Saejack*, *Hwangcha* and raw leaves increased mRNA expression of GLUT4 in the liver.

C. Determination of acute toxicity of *Jangguncha*

- Male and female mice were orally administered *Jangguncha* (0.25, 0.5, 1.1 and 2 g/kg/d) for 7 days.

- No toxicity was observed and *Jangguncha* extract was considered to be safe.

D. Elucidation of anti-diabetic effect of *Jangguncha* beverage products in the patients with type 2 diabetes mellitus

- Twenty patients with type 2 diabetes mellitus received *Jangguncha* beverage products or placebo for 12 weeks. Consumption of *Jangguncha* beverage products significantly decreased plasma glucose and HOMA-IR.

- Consumption of *Jangguncha* beverage significantly decreased plasma total cholesterol levels.

2. Determination of bioactive compounds from *Jangguncha* and development of anti-diabetic food products using *Jangguncha*

A. Analysis of polyphenolic compounds from *Jangguncha*

- **Establishment of quantification method of polyphenolic compounds from *Jangguncha***

Using the standards of tea catechins (EC, ECG, GCG, EGC, EGCG, C, GC, and GA) and caffeine, the optimal conditions for HPLC analysis were set up as following. Column, C₁₈; solvents, 0.05% TFA in water (Solvent A) and 0.05% TFA in acetonitrile (Solvent B); and gradient, linear gradient from 0 to 25% solvent B in 50min

- **Determination of extraction conditions from *Jangguncha***

The catechins were extracted with water from *Jangguncha* powder at 80°C for 15min. The amounts of catechins were analyzed with HPLC method.

- **Analysis of polyphenolic compounds from *Jangguncha* products and fresh leaf**

'*Woojeon*' has 124 mg of total catechins per 1 g of dried tea leaf and the amount of

total catechins of 'Saejack', 'Jungjak', and 'Daejak' were similar. The content of EGCG was highest in 'Woojeon', but 'Hwangcha' has only a little catechins due to enzymatic reaction during fermentation. The amount of catechins of fresh leaf prior to tea processing has higher than 'Woojeon'.

- Analysis of polyphenolic compounds from *Jangguncha* leaf according to harvest time and leaf size

The catechin contents of fresh *Jangguncha* leaf were higher when harvested in June to August and the size of leaf is smaller. After harvesting period of *Jangguncha* as tea, it is possible to make extracts having high contents of catechins at summer season.

- Analysis of polyphenolic compounds of green teas and *Jangguncha*

The catechin contents of 'Bosung' green tea and 'Hadong' green tea were not much different from *Jangguncha* products although the contents were varied a little bit according to the products. Total catechins and EGCG were higher in *Jangguncha* and 'Bosung' green tea than 'Hadong' green tea.

B. Purification and bioactivities of bioactive compounds from *Jangguncha*

- Solvent extraction of *Jangguncha*

Methanol extract was prepared from *Jangguncha* 'Saejak' with a yield of 25.2%. A series of solvent extract was prepared from methanol extract using n-hexane, chloroform, ethylacetate, n-butanol, and water with yields of 42.4, 21.9, 13.1, 8.0, and 5.0%, respectively. Among them, the yield of n-hexane extract was highest.

- Bioactivities of solvent extracts of *Jangguncha*

Antioxidant activity of ethylacetate fraction was best when determined by DPPH method ($IC_{50}=3.96\mu\text{g/mL}$) and TEAC method (1.59mM TE) and similar with ascorbic acid. Also, α -glucosidase and tyrosinase inhibitory activities of ethylacetate fraction were highest with IC_{50} values of $5.27\mu\text{g/mL}$ and $39.5\mu\text{g/mL}$, respectively. Total polyphenols and total flavonoids contents were highest in ethylacetate fraction with values of 25.3% and 3.6%, respectively.

- Analysis of bioactive compounds from ethylacetate fraction of *Jangguncha*

Major components of ethylacetate fraction having the best bioactivities were identified as catechins and EGCG was the major compound among them. The inhibition mechanism of EGCG against α -glucosidase followed a competitive inhibition with a inhibitor constant (K_i) of 4.94 nM.

C. Development of *Jangguncha* beverage containing bioactive components

- The stability of bioactive components in *Jangguncha*

A 30% of total catechins in *Jangguncha* 'Jungjak' extract was destroyed during a heat treatment at 100°C for 30 min. Ascorbic acid was able to protect the destruction of

catechins, and at a concentration of above 1.0 mg/mL, the loss of catechins was totally prevented. However, the taste of extract was sour because the pH was decreased less than 5.0.

- Decaffeination of *Jangguncha* extract

To reduce the amount of caffeine in *Jangguncha* extract, several techniques were applied including repeated-extraction, heat treatment of fresh leaf, pH control, enzyme treatment, and sub-supercritical carbon dioxide treatment. Repeated-extraction of *Jangguncha* leaf at 60°C could reduce about 5% of caffeine. The heat treatment of fresh leaf in boiling water reduced 40-50% of caffeine content, which was recommended for decaffeination method. When the pH was adjusted to acidic condition with addition of ascorbic acid, about 30% of caffeine content was reduced because of increase of catechins content rather than decrease of caffeine. The enzyme (Rapidase TF) treatment was not effected for decaffeination. The sub-supercritical CO₂ treatment was limited in its application due to expensive cost.

- Optimization of extraction condition of bioactive components from *Jangguncha*

For the extraction of active components from *Jangguncha* extract to develop a green tea beverage, 3 g of '*Jungjak*' was re-extracted with 200mL of water at 60°C for 10 min after first extraction for 5 min. A 0.02% of ascorbic acid was added for antioxidant activity and protection of catechins.

- Development of a prototype beverage of *Jangguncha*

After preparing the extract from *Jangguncha* '*Jungjak*', the extract was packaged in pouch and sterilized at 105°C for 15 min. The *Jangguncha* pouches were provided for a clinical trial of diabetic patients.

- Development of other product containing *Jangguncha*

Concentrate of *Jangguncha* extract and *Jangguncha* powder were prepared for an application to various foods. We tried to make bread, noodle, and pound cake containing concentrate or powder of *Jangguncha*.

3. Elucidation of beneficial effect of *Jangguncha* on diabetic nephropathy and underlying mechanism.

In this study, we have made efforts to find beneficial effects of *Jangguncha* on diabetic nephropathy, especially *in vitro* and *in vivo* model. This project consists of three subjects to fulfill the objectives. And the third is to determine the protective effect of *Jangguncha* on diabetic nephropathy and elucidate the mechanisms of that effect.

A. Preventive effect on oxalate-induced renal damage of *Jangguncha*

- *In vitro* study

- The number of viable MDCK cells increased as concentration of *Jangguncha* increased in MTT study.

- *In vivo* study

- *Jangguncha* groups had significantly higher 24-hour urine creatinine clearance level and lower 24-hour urine NAG and GGT level compared to those of control group.

B. Protective effect on diabetic nephropathy of *Jangguncha*

- *In vivo* study

- Mean body weight and 24-hour urine creatinine clearance level in raw leaves group was significantly lower than those of control and *Hwangcha* group. The amount of 24-hour urine microalbumin and total 24 hours protein excretion in Raw leaves and *hwangcha* group were significantly lower than those of control group. And raw leaves and *hwangcha* group showed preserved foot process of GBM with electron microscope.

C. Protective effect on diabetic nephropathy of *Jangguncha*

- *In vivo* study

- *Jangguncha* beverage group had decreased blood glucose level and 24-hour urine albumin level, increased 24-hour urine volume, creatinine clearance, and Na level compared to those of control group.

- Human study

- Twenty patients with type 2 diabetes mellitus received *Jangguncha* beverage products or placebo for 12 weeks. Consumption of *Jangguncha* beverage products significantly decreased systolic and diastolic blood pressure.

- Consumption of *Jangguncha* beverage significantly decreased plasma TBARS and increased erythrocyte catalase activity.

- Mechanism of action of *Jangguncha*

- The number of viable MDCK cells treated with sodium oxalate increased as concentration of *Jangguncha* extracts increased in order in MTT study. And after mixing with 1mM sodium oxalate for 30, 60, and 120 minutes with or without 50µg/L *Jangguncha* powder extracts, MDA production increased with time.

The results showed hypoglycemic effect and protective effect of *Jangguncha* against diabetic nephropathy. Anti-diabetic effects of beverage products based on *Jangguncha* were elucidated in animal model and patients with type 2 diabetes.

CONTENTS

Chapter 1. Outlines	25
Session 1. Research Objectives	25
Session 2. Research Necessity	25
Session 3. Research Scopes	28
Chapter 2. International and Domestic Technology Status	32
Session 1. International and Domestic Status	32
Session 2. Problems	33
Session 3. Solutions for the problems	33
Chapter 3. Methods and Results	35
Session 1. Study plan	35
Session 2. Overall design of the study	36
Session 3. Materials and methods.....	37
Session 4. Results and discussions.....	51
Chapter 4. Achievement and Contribution to related fields	109
Session 1. Achievements	109
Session 2. Contribution to related fields	112
Session 3. Contribution to the related fields	115
Chapter 5. Application of Results	116
Session 1. Outcome	116
Session 2. Necessity of additional research	118
Session 3. Application to other studies	119
Session 4. Methods for manufacturing	119
Chapter 6. Information collected from overseas	120
Chapter 7. References	121

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	25
제 1 절 연구개발 목적	25
제 2 절 연구개발 필요성	25
1. 장군차	25
2. 연구개발의 필요성	26
가. 장군차 연구의 필요성	26
나. 당뇨병의 심각성 및 당뇨병 연구의 필요성	27
다. 당뇨병성 신증 개선 연구의 필요성	28
제 3 절 연구개발 범위	28
1. 연구개발의 최종 목표	28
2. 연차별 연구개발 목표 및 내용	29
제 2 장 국내외 기술개발 현황	32
제 1 절 국내외 현황	32
1. 녹차 및 장군차에 관한 기존의 연구	32
가. 녹차의 생리활성에 관한 기존의 연구	32
나. 장군차에 관한 기존의 연구	32
2. 당뇨병의 심각성	32
제 2 절 문제점.....	33
제 3 절 문제점의 해결방안	33
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	35
제 1 절 연구개발 추진체계	35
제 2 절 연구개발 추진전략	36

제 3 절 연구개발 수행내용	37
1. 장군차의 혈당조절효과 규명 및 임상적용	37
가. 식후 혈당조절효과 및 포도당 수송 개선효과 규명	37
나. 당뇨동물 모델에 있어서 장군차의 당뇨병 개선효과 규명.....	38
다. 마우스에 있어서 장군차 추출물의 단기 안전성 확인	40
라. 제2형 당뇨병환자에 있어서 장군차음료 시제품의 항당뇨효능 확인	40
2. 장군차의 유효활성 성분 규명 및 항당뇨 제품 개발	42
가. 장군차의 폴리페놀류 성분 분석	42
나. 장군차의 유효활성성분의 정제 및 생리활성	42
다. 장군차의 활성성분이 포함된 음료의 개발	43
3. 장군차의 당뇨병성 신증 개선효과 및 작용 메커니즘 규명	47
가. 세포모델계에 있어서 신세포 보호효과 측정	47
나. 신장병 동물모델계에 있어서 장군차의 신장보호효과 규명	47
다. 제2형 당뇨동물모델에 있어서 장군차의 신장 보호효과	48
라. 제2형 당뇨동물 모델계에 있어서 장군차음료의 신장 보호효과	48
마. 제2형 당뇨병환자에 있어서 장군차음료 시제품의 신장 보호효과	49
바. 장군차의 당뇨병성 신증 개선 메커니즘 규명	50
제 4 절 연구개발 수행결과	51
1. 장군차의 혈당조절효과 규명 및 임상적용	51
가. 식후 혈당조절효과 및 포도당 수송 개선효과	51
나. 당뇨동물 모델에 있어서 장군차의 당뇨병 개선효과	54
다. 마우스에 있어서 장군차의 단기 안전성.....	61
라. 제2형 당뇨병환자에 있어서 장군차음료의 항당뇨 효능	65

2. 장군차의 유효활성 성분 규명 및 항당뇨 제품 개발	69
가. 장군차의 폴리페놀류 성분 분석	69
나. 장군차의 유효활성성분의 정제 및 생리 활성	75
다. 장군차의 활성성분이 포함된 음료의 개발	81
3. 장군차의 당뇨병성 신증 개선효과 및 작용 메커니즘 규명	93
가. 세포모델계에서 장군차의 신세포보호 효과	93
나. 신장병 동물모델계에 있어서 신장보호효과 규명	93
다. 제2형 당뇨동물모델에서 장군차의 당뇨병성 신증 개선효과	96
라. 제2형 당뇨동물모델에 있어서 장군차음료의 당뇨병성 신증 개선 효과 확인	101
마. 제2형 당뇨환자에 있어서 장군차음료의 당뇨병성 신증 개선효 과 확인	104
바. 장군차의 당뇨병성 신증 개선 메커니즘 규명	107
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	108
제 1 절 연차별 목표 달성도	108
1. 1차년도	108
2. 2차년도	109
3. 3차년도	110
제 2 절 연구개발 목표의 달성도	111
1. 연구평가의 착안점 및 달성도	111
가. 장군차의 혈당조절효과	112
나. 장군차의 당뇨병성 신증 개선효과	111
다. 유효활성성분의 분리 및 동정	111
라. 활성성분의 단기 안전성 및 가공적성 규명	111
마. 장군차 함유 가공식품의 개발 및 기능성 확인	111

제 3 절	관련분야 기여도	114
1.	기술적 측면	114
2.	경제·산업적 측면	114
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	115
제 1 절	연구성과	115
1.	국제학술회의 발표	115
2.	국내학술회의 발표	115
3.	특허	116
4.	기술이전	116
5.	논문	116
6.	전시회 참여	116
7.	타 연구개발사업에의 활용	116
제 2 절	추가연구의 필요성	117
제 3 절	타 연구에의 응용	118
제 4 절	실용화·산업화 추진방안	118
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보	119
제 7 장	참고문헌	120

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 목적

將軍茶의 血糖조절효과 및 신장 합병증 개선효과를 규명하고 그 활성 성분을 분리·동정하며, 將軍茶를 이용한 血糖조절용 가공식품을 생산하여 부가가치를 높임과 동시에 지역 특산품으로서의 홍보를 극대화하고자 함

제 2 절 연구개발 필요성

1. 將軍茶

- 가. 김해지역에 자생하는 녹차는 將軍茶라 하여 다른 지방의 차나무와 유전형질적인 차이점을 보이고 있지만 이에 대한 체계적인 연구는 거의 전무한 상태임.
- 나. 차나무(*Camellia sinensis*)는 중국이 원산지인 소엽종과 인도의 대엽종으로 크게 나눌 수 있으며 생김새에 따라 중국대엽종(中國大葉種: *Macrophhylla*), 중국소엽종(中國小葉種: *bohea*), 인도종(印度種: *assamica*), 산종(*shan*種: *buymensis*) 등 4변종이 있음. 하동, 보성 등 우리나라와 일본에서 재배되는 일반적인 녹차는 소엽종인데 반하여 將軍茶는 인도의 대엽종에 속함. 즉, 다른 차나무에 비해 잎이 둥글고 크며 부드럽고 맛과 향이 뛰어나 쓴 맛이 적고 담백한 특성을 가지고 있음
- 다. 가락국기와 조선불교통사 등 고서에 따르면 '將軍茶'는 서기 48년 허황옥이 혼수로 가져온 차 씨앗을 심은 것이 유래가 되었다고 기록되어 있음. 또한, 김해에는 예전부터 야생차 군락이 있었고 진례면 다곡(茶谷), 상동면 다시곡(茶蔴谷) 등 차와 관련된 지명들이 많음.
- 라. 김해 차나무가 '將軍茶'란 이름을 가지게 된 것은 고려 때로 조선의 '신증동국여지승람'에 고려 충렬왕이 왜구 정벌을 위해 모인 군사들을 격려하기 위해 김해에 들렀다가 이곳의 차나무를 보고 맛과 향이 차 중에서 으뜸이라하여 장군이라고 명명했다는 기록이 있지만 이후 차 문화가 계승, 발전되지 못하였음
- 마. 그러나 1999년부터 김해시의 지원으로 將軍茶 묘목지원사업을 통하여 현재 김해의 생림, 대동, 상동면 등지에 현재까지 약 30만평의 차밭이 조성되어 將軍茶가 재배되고 있으며 지역특산품으로서 상당한 인기를 누리고 있음. 2005년부터 생산된 將軍茶는 김해장군차 영농조합에서 수매하여 자체 제다공장에서 김해將軍茶인 우전, 세작, 중작, 황차를 제조한 후 전국유통망을 통해 판매하고 있음

2. 연구개발의 필요성

가. 將軍茶 연구의 필요성

- (1) 차는 우리 고유의 전통차지만 일본, 중국과 같이 생활차로서 차문화가 정착되어있지 못해 차 관련 산업의 발전이 현실적으로 매우 낙후되어 있는 실정임
- (2) 현재까지 발표된 녹차의 생리활성에 관한 연구결과는 중국소엽종에 대한 연구에 집중되어 있음. 일반적인 녹차에 비하여 將軍茶의 생리활성에 대한 연구보고는 전혀 없는 상태이며 將軍茶의 血糖저하효과 및 당뇨병성 신증 개선효과에 대한 연구 역시 전무한 상태임.
- (3) 將軍茶의 맛과 향에 관한 기본적인 성분 분석은 보고되었으나 catechin과 같은 폴리페놀류의 성분분석에 대한 연구는 이루어지지 않았음.
- (4) 차는 발효 정도에 따라 녹차, 황차, 오롱차, 홍차, 흑차로 분류되는데, 將軍茶는 녹차(우전, 세작, 중작)와 황차의 형태로 생산되고 있음. 녹차는 전혀 발효되지 않은 차이고 오롱차는 발효 정도가 20-65%, 홍차는 85% 이상 발효된 상태임. 한국, 일본 등지의 대부분의 차제품은 녹차로 시판되고 있으며, catechin 함량이 가장 높은 형태이고, 황차는 catechin 함량이 50-60% 정도 감소된 상태임. 따라서 차의 생리활성에 대한 연구는 녹차 제품에 집중되어 있으며 오롱차와 홍차에 대한 연구가 소수 있으나 황차에 대한 연구는 거의 없는 실정임. 將軍茶는 녹차 형태 외에 황차 형태의 경우에도 맛이 우수하여 기호성이 높은 것으로 알려져 있음. 따라서 녹차와 함께 황차의 생리활성을 구체적으로 규명하고 활성물질을 분리하는 연구를 통해 그 기능성을 차별화할 필요성이 있다고 사료됨.
- (5) 김해시와 주변지역의 경우 많은 농가가 전통적으로 재배하고 있던 단감의 가격이 근래에 하락하여 재배농가의 소득이 감소하여 큰 어려움을 겪고 있음. 따라서 많은 농가에서 고소득 작물로 전환하여 재배하고자 하는 의사가 강하나, 아직 고소득 작물이 선정되어 있지 않은 상태임. 따라서 김해시는 將軍茶를 지역특산물로 정립하려는 의지와 지원이 강하여 희망 농가에게 將軍茶 묘목을 무상으로 지원하고 1999-2005년에 6.15억원 이상을 김해將軍茶 육성사업에 지원하였으며, 향후 지속적인 지원을 강화하고자 함. 將軍茶는 생존력과 생산력이 우수하여 단감단지를 將軍茶 재배지로 전환하는 것이 가능하고 농지로 활용되고 있지 않는 임야에서도 將軍茶 재배가 가능함. 만약 將軍茶의 생리활성이 입증되고 고부가가치 상품이 개발된다면 많은 농가에서 단감재배지를 將軍茶 재배지로 전환시켜 소득을 증대시킬 수 있음. 김해시청의 관광홍보과에서 將軍茶의 홍보를 담당하고 있어 가야세계문화 축전, 김해 분청도자기 축제를 통해 將軍茶를 홍보하고 시청 본사청사에서 정기적으로 수시 將軍茶 시음회를 개최하고 있고, 티월드페스티벌, 차문화축전 등의 전국 규모 행사, APEC 등 세계규모의 행사를 통해 홍보하였음.

나. 糖尿病의 심각성 및 糖尿病 연구의 필요성

- (1) 국내 당뇨병환자의 수가 400-500만명(유병률 10%)정도로 추정되고, 전 세계적으로 총 3억 명 이상이 糖尿病 발병위험에 노출되어 있다고 보고되었음. 糖尿病은 우리나라에서 최근 10년간 가장 급증한 만성퇴행성질환으로 국민의 삶의 질을 저하시키고 의료비 지출의 주요 요인이 되고 있으며, 우리나라 국민의 사망요인 중 5위를 차지하고 있음. 糖尿病으로 인한 사망자수는 최근 10년간 200% 급증하였음 (www.nso.go.kr).
- (2) 현재 전 세계적으로 糖尿病으로 인한 의료비 지출은 연간 1,530억 달러 이상이며, 국내 糖尿病 치료제 시장 규모는 연간 약 1,300억원 수준임. 경구 糖尿病 치료제 시장은 꾸준한 증가추세를 보이고 있음. 당뇨 약물치료제는 대부분 원료 또는 완제품을 외국으로부터 수입하고 있어, 외화유출이 심각하여 이를 대체할 수 있는 연구개발이 필요함.
- (3) 세계의 기능성식품 시장규모가 2006년 3천771억달러에 달했으며, 국내 건강기능 식품시장규모는 매출액 기준 7천8억원 규모를 형성하였음. 일본의 경우 기능성식품 매출액 중 4.5%가 血糖조절관련 제품이었음. 국내의 경우에도 건강기능 식품 중 血糖 관련 제품의 매출은 급증하고 있음. 따라서 효능이 입증된 血糖 조절용 건강기능 제품에 대한 수요는 지속적으로 증가할 것으로 사료됨.
- (4) 糖尿病은 현재 완치법이 확립되어 있지 않은 질환임. 당뇨병환자 치료에 있어서 가장 중요한 목표는 血糖 조절임. 고血糖은 糖尿病 증세를 악화시키고, 당뇨병환자의 주된 사망요인인 당뇨합병증을 일으키는 주된 요인임. 또한 식후 고血糖은 인슐린 민감도를 감소시키고 췌장 기능을 저하시키므로 糖尿病 상태를 악화시키고, 당뇨 합병증을 일으킨다고 보고됨. 따라서 공복血糖과 식후 고血糖을 함께 조절할 수 있는 소재가 糖尿病을 가장 효율적으로 치료할 수 있음.
- (5) 현재까지 녹차의 糖尿病 개선효과를 규명한 연구들은 대부분 streptozotocin으로 당뇨를 유발한 제1형 당뇨 동물모델을 대상으로 한 실험에 집중되어 있음. 동물실험 중 제 2형 당뇨 동물모델인 db/db mouse를 대상으로 한 연구가 1건 있으나(Tsuneki *et al.*, 2004), 녹차 섭취 후 시간변화에 따른 血糖 변화 연구에 집중하였고 장기적인 녹차 섭취에 따른 血糖 조절 및 당뇨 합병증 개선 효과는 규명되지 않았음. 또한 db/db mouse는 제2형 당뇨병환자의 糖尿病性 腎症과 유사한 패턴을 보이는 동물모델로 알려져 있으나, 녹차를 비롯한 차(tea)의 섭취가 db/db mouse의 糖尿病性 腎症 개선에 미치는 효과를 조사한 연구는 없었음.
- (6) 糖尿病 환자는 약물요법에도 불구하고 약물의 부작용 또는 血糖 조절의 어려움이 있어 血糖조절 식품소재에 대한 요구가 급증하고 있으므로, 血糖조절용 기능성 식품의 시장이 급신장하고 있음.
- (7) 현재 將軍茶는 수확시기와 제조법에 따라 우전, 세작, 중작 또는 황차로 제조하여 시판되고, 그 외의 시기에는 차잎의 질이 떨어지므로 차잎은 차제품으로 활용되지 못하고 가지치기를 해야 함. 따라서 상품가치가 낮은 將軍茶 생잎을 활용하여 음료, 제과 및 제빵 등의 식품을 개발하고자 함. 개발된 제품은 부가가치를 증가시켜 농민의 소득증대에 기여할 수 있음.
- (8) 국내외 웰빙(well-being)붐의 영향에 힘입어, 개발되는 제품은 糖尿病 예방용 및 인슐린 저항성 개선 식품으로도 활용될 수 있음. 따라서 정상인에 있어서 인슐린저항성 증후군과 糖尿病을 예방할 수 있는 건강식품으로 활용될 수 있음.

다. 糖尿病性 腎症 개선 연구의 필요성

- (1) 대부분의 당뇨병환자는 심혈관계合併症, 糖尿病性 腎症을 포함한 合併症으로 사망하고 있어, 合併症의 예방과 지연은 치료의 주요목표임. 당뇨병환자의 치료와 合併症 조절에 있어서 가장 중요한 것은 血糖 조절이며, 이상지혈증(dyslipidemia) 조절 또한 중요한 요인임. 糖尿病性 腎症은 end-stage renal disease (ESRD)의 제1 주요 원인이며, 투석환자의 40% 이상이 당뇨병환자임. 또한 糖尿病性 腎症은 방치하면 투석 또는 신장이식을 해야하므로 당뇨병환자의 삶의 질 저하에 지대한 영향을 미침.
- (2) 糖尿病성 신장合併症 발생을 줄이기 위해서는 血糖조절이 우선되어야 함. 고血糖은 free oxygen radicals을 생산함으로써 oxidative stress를 유발하고 신장세포의 apoptosis를 유도하여, diabetic nephropathy의 발생에 기여할 수 있음이 보고되었음. 또한 장기적인 고血糖은 glomeruli의 transforming-growth factor- β_1 (TGF- β_1) expression을 증가시켜 mesangial matrix protein의 overproduction을 유도하므로 glomerular mesangial expansion을 초래하여 糖尿病性 腎症을 유발하게 됨. 또한 고혈압의 조절과 항산화능이 糖尿病性 腎症의 예방 및 치료에 있어서 중요함.
- (3) 당뇨병동물 모델 중 db/db mouse는 leptin receptor의 결여로 인해 비만과 당뇨를 동시에 나타내는 제2형 당뇨병동물모델이며, 당뇨병환자의 diabetic nephropathy 특징인 hyperfiltration 및 albuminuria, renal dysfunction을 순차적으로 나타내고 당뇨병환자의 diabetic nephropathy 연구를 할 수 있는 우수한 동물모델임이 입증되었음. 따라서 본 연구팀은 db/db mouse를 모델로 하여 將軍茶의 血糖 및 dyslipidemia 개선효과와 diabetic nephropathy 개선 메커니즘을 규명하고자 함.

제 3 절 연구개발 범위

1. 연구개발의 최종목표

將軍茶의 血糖조절효과 및 糖尿病性 腎症 개선효과를 규명하고 그 활성 성분을 분리·동정하며, 將軍茶를 이용한 血糖조절용 제품을 개발하여 부가가치를 높임과 동시에 지역특산품으로서의 홍보를 극대화한다.

2. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
1차 년도	2006	장군차의 혈당조절 및 신장보호 효과 규명 및 생리활성성 분 분석	제1세부과제	
			<i>In vitro</i> 에서 탄수화물 소화효소 저해활성 측정	- 장군차 우전, 세작, 황차, 생잎과 시판녹차의 용매별 추출물 제조 - α -Glucosidase 및 pancreatic α -amylase 저해활성 측정
			동물모델계에서 혈당 저하 효과 규명	- Streptozotocin 투여로 당뇨병을 유발한 흰쥐에게 당질부하시험 실시 - 진분 투여 후 장군차의 식후 혈당조절 효과를 측정함
			세포모델계에서 포도당 transport 개선효과 규명	- Adipocyte를 사용하여 말초조직의 포도당수송 개선효과 측정 - 농도별 인슐린 존재하에서 2-deoxy-D- [³ H]-glucose의 transport 정도 측정
			제2세부과제	
			장군차의 제품별 폴리페놀 성분 분석	- Catechin을 포함한 폴리페놀류의 성분분석 조건 확립 - 장군차 우전, 세작, 황차, 생잎의 폴리페놀류의 성분분석 - 산지별 녹차와 장군차의 성분 분석
			생리활성성분의 용매분획제조 및 생리활성 평가	- 장군차의 메탄올 추출물 제조 - 계통분획을 통한 여러 용매 분획 제조 - 용매분획의 DPPH 라디칼 소거능, α -glucosidase 저해활성 분석 - 혈당저해효과 및 신세포보호효과가 우수한 용매추출분획 선별
			협동과제	
			세포모델계에서 장군차의 신세포보호효과 규명	- MDCK 세포모델계에서 oxalate로 유도된 독성으로부터 신세포를 보호하는 효과를 MTT assay로 측정
			동물모델계에서 신장보호효과 규명	- Rat에게 gentamycin을 주사하여 장군차의 신장보호 효과 측정 - Urine volume 및 요성분 분석, creatinine 청소율을 측정하여 신기능 조사 - 요의 GGT 및 NAG을 측정하여 신손상 정도를 조사함

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
2차 년도	2007	장군차의 당뇨병과 당뇨병성 신증 개선효과 규명 및 유효활성 성분의 정제	제1세부과제	
			제2형 당뇨병 동물모델에 있어서 장군차의 장기간 섭취가 혈당 조절 및 지질대사 개선에 미치는 영향규명	<ul style="list-style-type: none"> - Db/db mouse에게 장군차를 세작, 황차, 생잎을 6주간 제공 - 혈당, 혈액 지질 profile, 인슐린, 당화헤모글로빈 농도 측정 - 간조직의 TBARS, 항산화효소계활성 측정
			혈당조절 메커니즘 규명	<ul style="list-style-type: none"> - 소장 조직의 amylase, maltase, sucrase 활성 측정 - 간조직의 혈당관련 단백질 gene expression 을 northern blot법으로 측정
			제2세부과제	
			시기별 장군차 생잎의 catechin류 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 매월 장군차잎을 크기별로 수확하여 시기별 catechin류의 함량 분석
			장군차의 추출물의 생리활성 측정 및 생리활성 성분 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 장군차 용매분획의 total polyphenols, total flavonoids 함량분석 - 장군차 추출물의 항산화 활성(DPPH, TEAC) 분석 - 장군차 추출물의 효소(α-glucosidase, tyrosinase) 저해활성 분석 - 활성이 우수한 용매 분획의 활성성분 분석 - EGCG의 α-glucosidase 저해메카니즘 분석(inhibition kinetics)
			유효활성성분의 안정성 측정	<ul style="list-style-type: none"> - 장군차의 추출조건 확립 - 가열처리에 의한 장군차 추출물의 catechin 함량변화 - 가열처리 시 ascorbic acid의 catechin 보호효과 측정
			협동과제	
제2형 당뇨병 동물모델에 있어서 당뇨병성 신증 개선효과 및 메커니즘 규명	<ul style="list-style-type: none"> - Db/db mouse에 있어서 장군차 황차, 생잎을 14주간 제공 - Urine volume, GFR, creatinine clearance를 측정하여 신기능 조사 - Microalbuminuria 및 proteinuria 정도 측정. 혈액의 전해질, BUN, creatinine 측정 - 신조직을 채취하여 해부현미경 및 전자현미경하에서 hypertrophy 및 mesangial matrix expansion 등 조직 손상도 측정 - 신장조직의 TBARS 농도, SOD, catalase, GSH-px 활성 측정 			

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
3차 년도	2008	당뇨병 개선용 장군차 응용 제품 개발 및 효능 확인	제1세부과제	
			장군차 추출물의 단기 안전성 조사	- Mouse를 대상으로 급성독성 시험 - 주정추출물을 농도별 공급 - 사망을 조사, 부검, 조직검사, 혈액검사
			제2형 당뇨병자에 있어서 개발한 장군차음료 제품의 항당뇨 효능 확인	- 당뇨병자 20인에게 장군차음료 제품 또는 placebo를 12주간 음용 (시료는 2세부과제 에서 개발하여 제공) - 시험기간 전·후의 공복혈당, 혈당조절 호르몬, 당화헤모글로빈, 혈액지질 profile, 체지방, 허리둘레, BMI를 측정하여 혈당조절효과 및 지질대사 개선도 측정
			제2세부과제	
			장군차의 유효활성성분의 추출조건 최적화	- 용매의 종류, 온도, 시간에 따른 유효활성성분의 추출효율 검토 후 최적 추출조건 확립 - 장군차 추출물의 카페인 함량 감소를 위한 방법 평가 (추출횟수, 생잎 열처리, pH 조절, 효소처리, 이산화탄소 추출 등)
			장군차의 활성성분이 포함된 음료 및 소재 개발	- 장군차음료의 추출조건 확립 - 장군차음료 시제품 생산 - 장군차 추출 농축액 및 장군차 분말 등 식품소재 개발 - 장군차 소재를 이용한 식품에의 적용 - 장군차음료의 혈당조절 효과 규명 (제1세부과제와 연계)
			협동과제	
			제2형 당뇨병자에 있어서 장군차음료가 신장기능 개선에 미치는 효과 규명	- 개발된 장군차음료가 신기능개선에 미치는 영향조사 (실험은 제1세부과제와 연계하여 실시) - 시험기간 전·후의 환자뇨의 Na, K, albumin, 혈장의 Na, K, BUN, creatinine 농도, GFR 측정 - 혈압 및 혈청의 지질과산화물, 항산화효소계 활성 측정
			제2형 당뇨병동물 모델계에서 장군차음료의 당뇨병성 신증 개선효과 규명	- Db/db mouse에게 개발된 장군차음료를 14주간 제공 - Urine 부피, GFR, creatinine clearance 측정 및 뇨의 알부민, 단백질 등 일반성상 검사. 혈액의 전해질, BUN, creatinine 측정 - 신장 TBARS 농도, 항산화효소계 활성 측정
활성성분의 당뇨병성 신증 개선 메커니즘 규명	- 장군차 추출물의 작용 메커니즘을 MDCK 세포주에서 적출한 신장조직에서 규명 - Free radicals 생성도를 측정하여 산화적 스트레스에 대한 방어효과 측정			

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 현황

1. 녹차 및 將軍茶에 관한 기존의 연구

가. 녹차의 생리활성에 관한 기존의 연구

- (1) 녹차에는 여러 가지 생리활성 물질이 함유되어 있으며, 그 중에서 주성분인 catechin은 폴리페놀화합물로서 epicatechin, epigallocatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin gallate의 4종으로 분류됨(Cho *et al.*, 2005).
- (2) 녹차로부터 혈중 콜레스테롤을 저하시키고, 고혈압이나 동맥경화를 예방하고 과산화지질의 생성을 억제하여 노화를 지연시키며, 중성지질의 생성을 억제하여 비만의 방지 등 성인병 예방이나 암 예방에 관계하는 기능성분들이 밝혀져 있고, 충치억제, 식품의 항산화 및 항균제, 중금속제거효과, 혈압강하 효과 등 여러 가지 생리활성효과를 나타낸다고 보고됨(Cho *et al.*, 2005).
- (3) 녹차의 항당뇨효과에 대한 기존 연구는 대부분 항산화효과에 대한 연구가 많았음.
- (4) 녹차의 항당뇨활성에 대한 연구도 보고되고 있는데, 대부분 동물모델계를 대상으로 한 연구임. 제1형 당뇨동물 모델에서도 녹차의 폴리페놀성분의 항당뇨활성이 우수하였다는 보고가 있으며(Zhu *et al.*, 1999), 환자를 대상으로 한 연구의 경우 糖尿病의 이환기간이 비교적 짧고, 체질량 지수가 높으며 혈중 인슐린 농도가 높은 제2형 糖尿病 환자에게 血糖저하 효과가 좋았음(Kim, 1999).
- (5) 녹차 catechin의 급여는 당뇨쥐 신장조직에서 생체 내 항산화방어기구인 SOD의 활성을 증가시켜 당뇨에 의하여 유발된 산화적스트레스에 의해 생성된 superoxide radical의 생성을 현저히 감소시켜 신장조직의 항산화계를 강화시키는 기능이 규명됨(Rhee *et al.*, 1998).

나. 將軍茶에 관한 기존의 연구

- (1) 2001년 김해시의 용역연구로 김해 將軍茶의 맛과 향에 대한 성분분석이 이루어져 있음.
- (2) 將軍茶의 성분 분석 결과 將軍茶 우전은 총질소(5.15%), 조단백(37.50%), 조지방(1.10%), 회분(4.90%)로 하동산 우전과 유사하였으며, 카페인 함량은 다른 품종에 비하여 낮게 나타났으나 탄닌의 함량은 높게 나타났음.

2. 糖尿病의 심각성

- 가. 糖尿病은 우리나라에서 최근 10년간 가장 급증한 질환으로 우리나라 국민의 사망요인 중 5위를 차지하고 있음(www.nso.go.kr). 국내 성인의 糖尿病 유병율은 9.2%로 보고되었고 당뇨환자의 수가 500만명 정도로 추정됨(보건복지부, 2005년 국민건강·영양조사). 당뇨환

자 중 95% 이상이 인슐린 저항성으로 인해 유도된 제2형 糖尿病 환자임.

- 나. 糖尿病은 현재 완치법이 확립되어 있지 않은 질환임. 당뇨병 치료에 있어서 가장 중요한 목표는 血糖 조절임. 고血糖은 糖尿病 증세를 악화시키고, 당뇨병자의 주된 사망요인인 당뇨병併症을 일으키는 주된 요인임. 糖尿病은 진단됨에 따라 심혈관계 질환, 糖尿病性 腎症과 같은 당뇨병併症을 초래하여 생명을 위협하고 의료비 부담의 증가, 경제활동 감소 등의 사회 경제적 문제를 야기함.
- 다. 糖尿病 환자는 약물요법을 시행하고 있으나, 糖尿病 치료에 사용되고 있는 경구 血糖강 하제는 장기 복용시 저血糖, 복통, 구토 등 여러 가지 부작용을 수반하고 있음. 따라서 부작용이 없는 천연물 유래 血糖조절 제품의 개발 필요성이 절실함.

제 2 절 문제점

- 1. 일반적인 녹차에 관한 성분분석, 이화학적 특성, 여러 가지 생리활성 등에 관한 연구는 활발히 이루어져 많은 논문이 보고되어 있는 반면 將軍茶에 관한 연구는 거의 전무한 상황임.
- 2. 將軍茶의 항당뇨 활성 및 糖尿病性 腎症 개선효과에 관한 보고는 전무함.
- 3. 기존의 糖尿病 치료제는 가격이 비싸 지속적으로 복용하기 어려우며, 부작용을 나타낼 수 있어 사용에 제한적일 수 있음.

제 3 절 문제점의 해결방안

현재의 당뇨치료제가 가지고 있는 문제점을 해결할 수 있는 방법으로 將軍茶로부터 血糖조절 및 糖尿病性 腎症 예방용 소재의 개발이 가장 적합

1. 부작용이 없는 천연소재의 개발

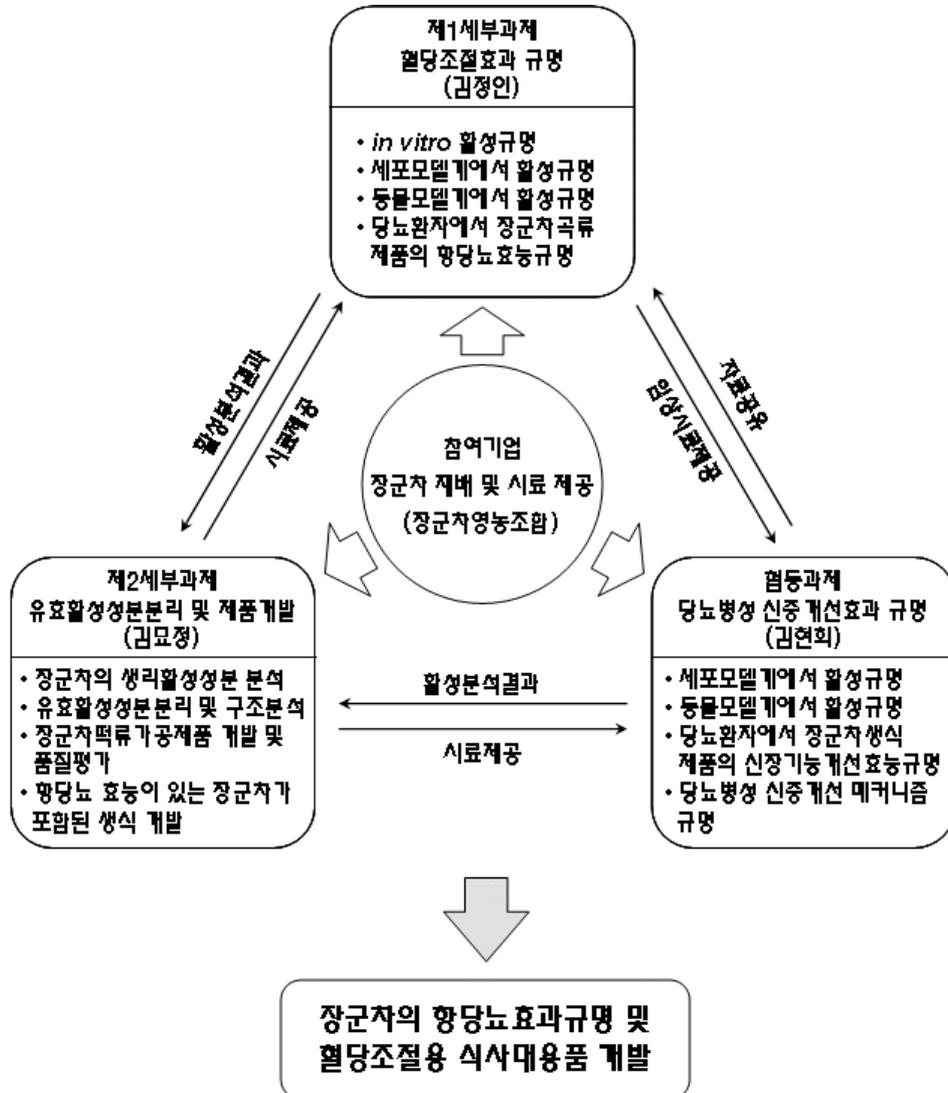
- 가. 將軍茶는 탄수화물 소화효소 저해활성이 우수하여 血糖조절 효과가 있을 것으로 기대됨. 당뇨병자의 치료에 있어서 血糖조절은 가장 중요한 목표임.
- 나. 將軍茶는 항산화 활성이 우수하여 당뇨 併症 개선효과가 기대됨.
- 다. 將軍茶는 부작용이 없는 천연소재로 일상생활에서 섭취하기 용이하여 기존의 糖尿病 치료제를 보조하거나 대체할 수 있을 것으로 기대됨.

2. 將軍茶의 유효활성성분 분석 및 생리활성 규명

- 가. 將軍茶는 일반녹차와 유전적 형질이 다른 대엽종에 속하는 녹차이므로 catechin 등 유효성분의 함량 분석 및 항산화, 항당뇨, 당뇨合併症 개선효과 등의 생리활성을 평가하여 將軍茶의 기초 자료로 활용할 수 있도록 함.
- 나. 將軍茶 제품군(우전, 세작, 중작, 황차 등)과 기타 일반 녹차의 활성성분을 분석한 후 그 차이를 비교하여 기초 자료로 활용할 수 있도록 함.
- 다. 將軍茶의 유효활성성분 및 생리활성에 대한 결과를 활용하여 將軍茶 제품의 경쟁력을 확보할 수 있음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발 추진체계



제 2 절 연구개발 추진전략

참여기업에서 제공한 將軍茶 시료의 血糖저해효과 및 신장보호효과를 규명하며 유효활성성분을 분리하여 구조를 분석한다. 糖尿病 개선용 將軍茶 응용 제품을 개발하여 그 임상적 효능을 평가한다. 각 과제별 추진전략은 아래와 같다.

1. 참여기업

將軍茶의 재배 및 생산을 통해 시료를 제공한다.

2. 제1세부과제

세포 및 동물모델계에서의 將軍茶의 血糖저하효과 규명 및 제2세부과제에서 분리한 활성물질의 血糖저하효과를 평가하고 將軍茶 응용 제품의 糖尿病 개선효능을 임상시험을 통하여 확인한다.

3. 제2세부과제

將軍茶의 생리활성물질 분석, 분리정제 및 구조를 규명하고 제1세부과제 및 협동과제와 연계하여 분리된 성분의 활성을 평가한다. 분리된 활성성분 및 將軍茶 응용 제품을 개발하여 제1세부과제와 협동과제에 제공한다.

4. 협동과제

세포 및 동물모델계에서 將軍茶의 신장보호효과 및 糖尿病性 腎症 개선효과와 작용 메커니즘을 규명하고, 제2세부과제에서 개발한 將軍茶음료의 糖尿病性 腎症 개선 효능을 임상 및 동물모델계에서 확인한다.

제 3 절 연구개발 수행내용

1. 장군차의 혈당조절효과 규명 및 임상적용

가. 식후 血糖조절 효과 및 포도당 수송 개선효과 규명

(1) *In vitro*에서 탄수화물 소화효소 저해활성 측정

將軍茶 우전, 세작, 황차 및 동결건조된 將軍茶의 생잎과 시판 녹차로부터 메탄올 추출물을 제조하였다. 시료 중량의 10배에 해당하는 메탄올로 12시간동안 추출한 후, 감압여과하여 추출액과 잔사를 분리하였다. 잔사 중량의 5배에 해당하는 메탄올로 12시간 추출한 후, 감압여과하여 추출액을 얻었다. 將軍茶 우전, 세작, 황차, 생잎과 녹차 추출물의 수율(yield)은 각각 19.5%, 20.3%, 23.1%, 24.2%, 21.5%로 나타났다. 각 추출물의 yeast α -glucosidase 저해활성은 *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside를 기질로 하여 Watanabe법(1997)으로 측정하였다. Porcine pancreatic α -amylase 저해활성은 *p*-nitrophenyl- α -D-maltoheptaoside를 기질로 하여 측정하였다. 경구血糖강하제인 acarbose를 표준품으로 사용하였으며, 저해활성은 각 시료의 농도를 0.5 mg/mL로 하여 3회 반복 측정한 값의 평균값으로 나타내었다.

(2) Streptozotocin 유발 당뇨병쥐에 있어서 식후 血糖저하효과 측정

In vitro assay에서 탄수화물 소화효소 저해활성이 우수한 것으로 나타났으며, 가격면에서 저렴하여 향후 제품을 개발할 때 경제성이 큰 세작, 황차 및 생잎을 동물실험에 사용하는 시료로 선정하였다. 체중 200-250 g의 rat에게 streptozotocin을 투여하여(60mg/kg) 당뇨병을 유발시키고, 48시간 후에 꼬리정맥에서 채혈하여 공복血糖이 200 mg/dL 이상으로 나타난 동물을 실험에 사용하였다(n=32). 시료의 식후 血糖조절효과를 측정하기 위하여 공복상태의 흰쥐에게 전분(1g/kg) 또는 전분과 함께 세작, 황차 및 생잎 추출물(500 mg/kg)을 경구 투여하였다. 경구 투여 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240분 후에 꼬리정맥에서 채혈하여, 혈장의 포도당 농도를 효소법으로 측정하였다. 공복시와 비교하여 각 시점의 血糖 증가치를 측정하고, 血糖변화곡선의 면적(area under the curve, AUC)을 계산하였다. 각 군간의 유의성 검정은 ANOVA를 사용하여 실시하였고, Tukey's test를 follow-up test로 사용하였다 ($p < 0.05$).

(3) 세포모델계에 있어서 말초조직의 포도당 수송(glucose transport) 개선 효과 측정

세포 모델계를 사용하여 將軍茶 우전 및 세작, 황차, 생잎, 녹차 추출물이 glucose uptake에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 3T3-L1 세포를 American Type Collection (ATCC)에서 분양 받았다. 세포는 10% fetal bovine serum을 함유하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지에서 배양하였다. 세포 배양 온도 및 CO₂ 농도는 37°C, 5%를 유지하도록 하였다. 將軍茶 우전, 세작, 황차, 생잎 및 시판 녹차 메탄올 추출물의 세포독성을 측정하기 위하여 96 well plate에 세포를 5×10³ cells/well로 plating 하였다. 시료추출액을 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1, 16 ug/mL 농도로 투여한 후 CO₂ incubator에서 48시간 배양하

였다. 배지를 제거하고 MTT 용액으로 염색하여 microplate reader를 이용하여 580nm에서 흡광도를 측정하였다.

3T3-L1 cell을 7.5% FBS와 1% antibiotics를 함유한 DMEG 배지에서 배양한 후, 0.5mM 1-methyl-3-isobutyl-xanthine, 2 μ g/mL dexamethazone를 함유한 DMEM을 사용하여 adipocyte로 분화시켰다. 10 nM insulin 존재 하에 또는 insulin을 첨가하지 않은 상태에서 각 추출물을 가하여 10-30분간 incubation하고 KRP buffer와 2-deoxy-D-[³H]-glucose를 가하여 10분간 반응시킨 후, 세포를 washing하고 Triton으로 lyse한 후 방사능을 측정하여 glucose uptake를 조사하였다. 삼백초 및 사인 추출물의 glucose uptake는 대조군 %로 나타내었다.

나. 당뇨병 동물 모델에 있어서 將軍茶의 糖尿病 개선효과 규명

(1) 실험동물 및 실험디자인

*In vitro*에서 탄수화물 소화효소 저해활성이 우수한 것으로 나타난 將軍茶 세작, 황차, 생잎을 동결건조한 후, AOAC법으로 일반성분과 식이섬유 함량을 분석하였다. 생후 5주령의 수컷 C57BL/Ks db/db 마우스(n=24)를 구입하여 1주일간 적응기간이 끝난 후 난괴법에 따라 동물을 4군으로 나누었다. 대조군에게는 AIN-93G 식이를, 실험군에게는 각각 동결건조한 將軍茶 세작, 황차, 생잎을 분쇄하여 식이의 5% 수준으로 6주간 *ad libitum*으로 공급하였다(Table 1). 실험기간 동안 체중과 식이섭취량은 주 2회 측정하였다. 식이 섭취 시작 일로부터 6주가 지난 후, 동물을 12시간 절식시키고, 동물을 심장채혈법으로 희생시켰다. 부고환 지방조직은 적출하여 무게를 측정하였고, 간조직은 0.9% 생리식염수에 헝구어 물기를 제거한 다음 분석시까지 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 소장점막은 얼음 위에서 slide glass로 긁어 채취하였다. 당화헤모글로빈 측정에 사용할 혈액 50 μ l를 제외한 나머지 혈액은 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 후 혈장을 수집하여 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

Table 1. Composition of diets

Ingredients	Basal diet (%)	<i>Saejack</i> (%)	<i>Hwangcha</i> (%)	Raw leaves (%)
Corn starch	39.8	39.45	39.45	39.25
Casein	20.0	18.2	19.0	18.9
Dextrinized starch	13.2	13.2	13.2	13.2
Sucrose	10.0	8.6	8.8	9.0
Alpha-cellulose	5.0	3.6	2.7	2.7
Mineral mixture	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture	1.0	1.0	1.0	1.0
L-cystine	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>Tert</i> -butyl hydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014
Soybean oil	7.0	6.9	6.8	6.9
<i>Saejack</i>	-	5	-	-
<i>Hwangcha</i>	-	-	5	-
Raw leaves	-	-	-	5

(2) 혈액 및 혈장 분석

血糖은 효소법으로 측정하였으며, 혈장 인슐린 농도는 radioimmunoassay로 측정하였다. 혈액 당화헤모글로빈 농도는 칼럼 크로마토그래피법으로 측정하였다. 혈장의 중성지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 농도는 효소법으로 측정하였다.

(3) 소장의 탄수화물 소화효소 저해활성 측정

소장에서 α -amylase 활성은 Bernfeld법(1955)을 이용하여 가용성 전분으로부터 효소에 의해서 유리된 전체 환원당의 함량으로 측정하였다. 효소 활성은 1분 동안 1μ mole의 maltose를 유리시키는 효소의 양을 1unit로 하였다. 소장의 α -glucosidase(maltase) 및 sucrase 활성은 Dahqvist의 방법(1964)으로 측정하였으며, 효소 활성은 1분 동안 1μ mole의 기질을 분해된 이당류의 양을 1unit로 하였다.

(4) 간 조직의 GLUT4 유전자 발현수준 측정

將軍茶의 장기간 섭취가 glucose transporter(GLUT4)의 gene expression에 미치는 영향을 조사하였다. 동물의 간 조직의 total RNA를 TRI reagent를 사용하여 분리하였다. 분리된 total RNA를 1.2% formaldehyde-agarose gel에 fractionation한 후 Hybond N+ nylon membrane에 transfer하였다. Target gene의 32 P-labeled cDNA를 probe로 사용하여 northern blot hybridization을 실시하였다.

(5) 간조직의 지질과산화 및 항산화 효소계 활성 측정

간 조직의 지질과산화물의 측정은 Ohkawa 등의 방법(1979)을 이용하여, thiobarbituric acid(TBA)와 반응하는 malondialdehyde(MDA)의 함량을 측정하였고 표준용액으로는 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP)을 사용하였다. 간조직의 total SOD 활성은 Marklund와 Marklund의 방법(1974)을 이용하여 측정하였고, 1분 동안 pyrogallol의 자동산화를 50%까지 억제하는데 요구되는 효소의 양을 1 unit로 하였다. Catalase 활성은 Abei법(1984)으로 측정하였으며, 효소 활성은 1분 동안 1μ mole의 기질을 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

(6) 통계처리

실험 분석결과는 평균 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 표시하였다. 각 군의 평균치의 유의성 검정은 분산분석(ANOVA)를 사용하여 실시하였고, Tukey's test를 followup test로 사용하였다 ($p<0.05$).

다. 마우스에 있어서 將軍茶 추출물의 단기 안전성 확인

(1) 실험동물 및 실험 디자인

생후 5주령의 수컷 및 암컷 ICR 마우스(n=100)를 구입하여 1주일간 적응기간이 끝난 후 난괴법에 따라 동물을 각각 5군으로 나누었다. 대조군에게는 식염수를, 실험군에게는 將軍茶 주정추출물을 각각 0.25, 0.5, 1 및 2 g/kg으로 1일 1회, 7일간 경구 투여하였다. 將軍茶 추출물 경구투여 시작일로부터 8일째 동물을 12시간 절식시키고, 동물을 심장채혈법으로 희생시켰다. 시험기간 중 모든 동물의 체중은 매일 측정하였다.

(2) 일반증상, 폐사의 관찰 및 부검

투여 당일은 투여 후 1시간부터 6시간까지 관찰하였고, 투여 다음날부터 7일까지는 1일 1회 일반 증상 및 중독 증상, 사망의 유무를 관찰하였다. 동물을 희생시킨 후 육안으로 각 장기의 소견을 관찰하였다.

(3) 혈액학적 검사

자동혈액검사기기를 이용하여 백혈구(WBC), 적혈구(RBC), 헤모글로빈(Hb), hematocrit (Hct), blood platelet (BLP), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)를 측정하여 혈액의 hematology를 조사하였다. 혈장 총 단백질, albumin, LDH, GOT, GPT, BUN, creatinine, 血糖, 콜레스테롤, 중성지방 농도를 효소법으로 측정하였다.

(4) 통계처리

실험 분석결과는 평균±표준편차(mean±SD)로 표시하였다. 각 군의 평균치의 유의성 검정은 분산분석(ANOVA)를 사용하여 실시하였고, Tukey's test를 followup test로 사용하였다(p<0.05).

라. 제2형 당뇨병환자에 있어서 將軍茶음료 시제품의 항당뇨효능 확인

(1) 환자 선별 및 디자인

20인의 제2형 당뇨병환자(남 10인, 여 10인)를 대상으로 將軍茶음료 시제품의 糖尿病 개선효과를 규명하였다. 당뇨병환자를 두 군으로 나누어 시험군은 제2세부과제에서 개발한 將軍茶음료를 12주 동안 200 mL/day(아침, 저녁 식사후 100 mL씩 1일 2회) 음용하고, 대조군은 보리차를 베이스로 제조한 placebo를 동량 섭취하도록 하였다. 將軍茶음료 시제품과 placebo는 제2 세부과제에서 제공받아 사용하였다. 당뇨병환자는 다음의 조건을 만족하는자로 선별하였다.

- 나이 : 35-75세
- 체질량지수 : 22-32kg/m²
- 공복 血糖 : 126-270mg/dL
- 당화헤모글로빈 : > 6.5%

(2) 신체계측

시험기간 전, 후에 신장 및 체중을 측정하여 체질량지수(body mass index, BMI)를 구하였고, 허리둘레, 체지방은 체지방계(TBF-105, Tanica, Japan)를 사용하여 측정하였다.

(3) 혈액 분석

시험기간 전, 후에 공복 血糖을 효소법으로 측정하였고, 혈청 인슐린 농도를 radioimmunoassay법으로, 당화헤모글로빈을 크로마토그래피법으로 측정하여 血糖조절 효과를 조사하였다. 시험기간 전, 후에 혈청 콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 농도를 효소법으로 측정하여 지질대사 개선도를 규명하였다. 간기능을 측정하기 위하여 GOT, GPT, GGT 활성을 측정하였다. 인슐린저항성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Homeostasis model assessment for insulin resistance(HOMA-IR)을 아래의 공식에 의해 구하였다.

$$\text{HOMA-IR} = \text{Insulin } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glucose (mmol/L)} / 22.5$$

(4) 통계처리

대조군과 將軍茶음료군별로 시험 전 및 12주의 시험기간 종료 후의 측정치의 차이 (difference)를 구하고, difference간의 유의성 검증은 Student's t-test를 사용하여 실시하였다($p < 0.05$).

2. 장군차의 유효활성 성분 규명 및 항당뇨 제품 개발

가. 將軍茶의 폴리페놀류 성분 분석

(1) 將軍茶 폴리페놀류의 정량 분석방법 확립

최적 추출조건에 의해 추출된 추출물은 HPLC를 사용하여 將軍茶에 포함된 폴리페놀류를 정량 분석하였다. HPLC 조건으로 Column은 Gemini 5 μ C₁₈ column (Phenomenex), Eluent는 Water (0.05% TFA 첨가, A용매), Acetonitrile (0.05% TFA 첨가, B용매), Gradient는 0-25%B in 50min이며 catechin류 표준물질로 정량곡선 작성 후 각 성분을 정량하였다(Swain *et al.*, 1959; Salminen *et al.*, 1999).

(2) 將軍茶의 추출조건 결정

將軍茶의 여러 가지 조건에서 추출하여 HPLC분석을 통하여 최적 추출조건을 확립하였다. 將軍茶 잎은 동결건조기를 이용하여 냉동건조하여 분말화한 후 시료로 사용하였고, 온도 및 추출시간에 따라 추출한 후 용출된 폴리페놀류를 HPLC로 분석하여 정량하였다.

(3) 將軍茶 제품별 및 생잎의 폴리페놀류 분석

將軍茶의 우전, 세작, 중작, 대작, 황차 및 생잎에 함유된 폴리페놀류를 정량분석하여 비교하였다. 각 시료는 1.5g을 100°C의 물에서 15분간 추출한 후 분석하였다. 추출물 중의 폴리페놀류를 HPLC로 분석한 후 그 함량을 비교 분석하였다.

(4) 將軍茶 생잎의 크기 및 시기별 폴리페놀류 분석

매월 將軍茶잎을 크기별로 수확하여 catechin류의 함량을 분석하였다. 2007년 4월부터 12월까지 매월 크기에 따라 5종류의 잎을 채취한 후 catechin 함량을 HPLC를 사용하여 측정하였다. Catechin은 메탄올을 첨가하여 추출하였으며 Gemini 5 μ C₁₈ column을 사용하여 분석하였다 (Lihu *et al.*, 2005).

(5) 산지별 녹차와 將軍茶의 폴리페놀류 분석

이미 잘 알려져 상품화 되어있는 하동녹차, 보성녹차와 將軍茶의 폴리페놀류의 함량을 비교분석하였다. 산지별 녹차 즉, 하동녹차와 보성녹차와 將軍茶의 우전, 세작, 중작, 대작 및 생잎에 함유된 폴리페놀류를 HPLC로 분석한 후 그 함량을 비교 분석하였다.

나. 將軍茶의 유효활성성분의 정제 및 생리활성

(1) 將軍茶 용매추출 및 계통분획

將軍茶 세작으로부터 메탄올 추출물을 제조한 후 여러 용매로 계통분획하였다. 將軍茶 세작 무게의 10배에 해당하는 메탄올을 첨가하여 12시간씩 5회 추출하여 將軍茶 메탄올 추출물에 증류수를 가한 후 *n*-hexane, chloroform, ethylacetate, *n*-butanol을 순차적으로 가하여 분획을 실시하였다.

(2) 將軍茶 용매분획의 생리활성 측정

將軍茶 용매 추출물의 항산화활성, α -glucosidase 및 tyrosinase 저해 활성 측정하였다. 항산화활성은 DPPH 방법을 사용하여 free radical scavenging 활성을 측정하였고, Bakers yeast α -glucosidase를 효소로 *p*-nitrophenyl glucoside를 기질로 사용하였으며 버섯에서 유래한 tyrosinase에 대한 추출물의 저해활성을 측정하였다. 폴리페놀 정량은 Folin-ciocalteau 방법으로 플라보노이드 정량은 Siddhrajy 방법으로 측정하여 결과를 나타내었다(Babu *et al.*, 2007; Takara *et al.*, 2007; No *et al.*, 1999).

(3) 將軍茶 활성분획의 주요 성분분석

생리활성이 강한 용매분획의 성분을 HPLC를 사용하여 분석하였다. 주성분인 EGCG의 α -glucosidase 저해 활성을 측정하고, inhibition kinetics를 수행하여 Lineweaver-Burk plot을 사용하여 효소저해 메커니즘 및 저해상수(K_i)를 결정하였다.

다. 將軍茶의 활성성분이 포함된 음료의 개발

(1) 將軍茶 유효활성성분의 안정성 평가

將軍茶의 중작 추출조건 확립 및 가열처리에 의한 將軍茶 추출물의 catechin 함량 변화를 연구하였다. 將軍茶 중작을 여러 온도에서 추출한 후 관능적 특성이 우수한 추출방법을 선정하고 catechin의 함량을 측정하였다. 將軍茶 추출물을 가열처리(100°C, 30분)한 후 catechin 감소 정도를 분석하고 ascorbic acid를 첨가하여 catechin 보호 효과를 측정하였다.

(2) 將軍茶음료의 카페인 함량 감소를 위한 전처리 방법 평가

(가) 중작의 2차 추출

중작 2g을 물 100mL에 넣어 90°C에서 1, 2분간 1차 추출 후, 60, 70°C에서 5분간 2차 추출하여 HPLC성분 분석을 하였다.추출액 1mL을 취하여 10,000rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 취해 0.45 μ m syringe filter를 이용하여 filter 후 3% Tyrosol 10 μ l를 첨가하여 HPLC 분석용 sample로 하였다. HPLC는 DAD detector가 장착된 Dionex사의 것을 사용하였다. Column은 gemini 5 μ m C18 column(250 \times 4.6 mm, Phenomenex, USA)를 사용하였고 이동상은 0.05%(v/v) TFA(Trifluoroacetic acid)를 포함한 물을 A용매로, 0.05%(v/v) TFA를 포함한 ACN(acetonitrile)를 B용매로 사용하였다. Gradient 조건은 B용매를 0-25%가 되도록 50분간 직선적으로 증가시켰다. 270nm에서 흡광도를 측정하였고, flow rate는 1mL/min의 속도로 흘러주었고, 시료는 20 μ l씩 주입하였다.

(나) 將軍茶 생잎 열처리

將軍茶 생잎 2g을 끓는 물에서 1, 3, 5 분 동안 열처리 후, 동결건조 하여 분말화 하였다. 將軍茶 가루 0.15g을 methanol 10mL에 상온에서 12시간동안 추출하였다. 추출액 1mL을 취해 3% Tyrosol을 10 μ l 넣어 10,000rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액은 0.45 μ l syringe filter를 이용하여 filter하여 HPLC 분석용 sample로 하였다 (Huiling *et al.*, 2007).

(다) 추출액 pH에 따른 catechin 변화

카페인 함량을 낮추기 위하여 추출액의 pH를 조절하였다. 추출액의 pH를 조절하기 위하여 10% ascorbic acid 용액을 사용하였으며, 추출액의 pH는 pH 4, 5, 6으로 조절하였다. pH를 조절한 추출액은 끓여서 70°C로 식힌 후 사용하였고, 추출액 100mL에 將軍茶 1.5g을 첨가하여 70°C에서 2분간 추출하였다. 추출한 將軍茶의 맛과 향을 비교하였고, HPLC를 이용하여 성분분석을 하였다 (Kim *et al.*, 1999).

(라) 추출 시 효소 첨가

Caffeine 함량을 낮추기 위해 추출 시 효소를 첨가하여 추출하였다. 중작 1g을 물 100mL에 넣어 Rapidase TF를 50μl를 첨가하여 60°C에서 5분간 추출 후, 80°C에서 30분간 중탕하여 효소 반응을 정지 시킨 후, HPLC를 이용하여 성분 분석을 하였다 (Lee *et al.*, 2008).

(마) 이산화탄소 아임계 추출

① 중작

중작 20g을 이산화탄소 아임계추출기를 이용하여 overnight(약 20시간)으로 추출 하였다. 이산화탄소 아임계추출한 중작 3을 200mL에 넣어 60°C에서 5분 동안 추출 하였다. 추출 후 HPLC를 이용하여 성분 분석을 하였다 (Huang *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2005).

② 분쇄한 중작

중작 20g을 막자사발로 고운 가루 상태로 만들어 이산화탄소 아임계 추출기를 이용하여 overnight(약 20시간)으로 추출하였다. 이산화탄소 아임계 추출한 중작 3을 200mL에 넣어 60°C에서 5분 동안 추출 하였다. 추출 후 HPLC를 이용하여 성분 분석을 하였다 (Huang *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2005).

(3) 將軍茶의 유효활성성분의 추출조건 최적화

용매의 종류, 온도, 시간에 따른 유효활성성분의 추출효율 검토 후 최적 추출조건 확립하였다. 특히 total catechin과 caffeine의 분석조건에 가장 유리한 추출조건을 선택하였다.

(가) 중작의 양

차잎의 양을 물 200mL당 1g, 2g, 3g 으로 하여 60°C에서 5분간 추출 하여 맛을 비교하였으며, HPLC를 이용하여 성분 분석을 하였다. 추출액 1mL을 취하여 10,000rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 취해 0.45μm syringe filter를 이용하여 filter 후 3% Tyrosol 10μl를 첨가하여 HPLC 분석용 sample로 하였다. HPLC는 DAD detector가 장착된 Dionex사의 것을 사용하였다. Column은 gemini 5μm C18 column(250×4.6 mm, Phenomenex, USA)를 사용하였고 이동상은 0.05%(v/v) TFA(trifluoroacetic acid)를 포함한 물을 A용매로, 0.05%(v/v) TFA를 포함한 ACN(acetonitrile)를 B용매로 사용하였다. Gradient 조건은 B용매를 0-25%가 되도록 50분간 직선적으로 증가시켰다. 270nm에서 흡광도를 측정하였고, flow rate는 1mL/min의 속도로 흘러주었고, 시료는 20μl씩 주입하였다.

(나) 2차 추출

2g/200mL으로 60℃에서 1차 추출과 2차 추출의 시간을 달리하여 추출하였다. 1차 추출 시간은 2, 5, 10 분으로 하였으며, 2차 추출 시간 역시 2, 5, 10 분으로 하여 추출하여 맛과 향 등의 기호도를 비교하였으며, HPLC를 이용하여 성분 분석을 하였다.

(다) 온도별 추출

2차 추출한 것 중 맛이 좋고, total catechin이 가장 많았던 조건인 5min 추출 후, 다시 10분간 2차 추출 한 조건을 바탕으로 추출 온도를 설정하기 위하여 60, 70, 80 ℃에서 추출하여 맛과 향 등의 기호도를 비교 하였으며, HPLC를 이용하여 성분 분석을 하였다.

(4) 將軍茶음료의 시제품 개발

설정 된 추출 조건에 따라, 將軍茶 3g/200mL의 농도로 60℃에서 5분간 1차 추출 후, 그 잎을 건져내어 60℃에서 다시 10분간 추출 하였다. 추출액에는 10% ascorbic acid 용액을 0.02%가 되도록 첨가하고 1% sodium carbonate 용액을 첨가하여 pH 6이 되도록 조절 하였다. 완성된 추출액은 레토르트 포장기로 100mL씩 주입하여 포장하였으며, 포장 후 레토르트 살균기를 이용하여, 105℃, 1.5기압에서 15분간 살균하였다.

(5) 기타 將軍茶 응용 제품의 개발

(가) 將軍茶 추출 농축액

기초실험을 통해서 將軍茶의 액량대비 투입량을 5%(5g/100g)로 결정하고 60℃에서 60분 동안 열수 추출하였다. 추출액은 80mesh 표준여과망체를 통과시켜 얻었으며, 여과액은 60℃로 유지하여 최종농도가 8%Brix가 되도록 진공으로 농축 시켰다. 농축액은 진공단계에서 발생 했을지 모를 탄화 찌꺼기등을 제거하기 위해 다시 80mesh 표준여과망체를 통과시켰으며, 최종 농축액은 85℃에서 30분간 살균 처리 하였다.

(나) 將軍茶 분말

將軍茶 중작을 열풍건조기로 60℃에서 2시간 동안 건조 시킨 후 분쇄기(pin mill)로 분쇄한 후 50mesh 표준여과망체를 통과시켰다.

(다) 가공식품의 개발의 예

밀가루 중량의 1%가 되도록 농축액이나 분말을 첨가하여 여러 가지 제품에 응용하였다.

① 식빵

식빵을 만들기 위해 밀가루 376g와 밀가루 중량의 1%가 되도록 將軍茶 분말을 첨가하였다. 여기에 계란 1개와 이스트, 물 170mL을 첨가하여 오성 웰텍 제빵기(HPB-157C)를 이용하여 식빵을 제조하였다.

② 국수

밀가루 50g에 밀가루 중량의 1%가 되도록 將軍茶 분말을 첨가하였다. 물 40mL을 넣어 반죽하여 국수를 만들었다.

③ 파운드 케이크

파운드 케이크 가루 300g에 파운드케이크 중량의 1%가 되도록 將軍茶 추출액(8 Brix)을 첨가하여 180℃에서 40분 동안 오븐에서 구웠다.

3. 장군차의 당뇨병성 신증 개선효과 및 작용 메커니즘 규명

가. 세포모델계에 있어서 oxalate로 유도된 독성으로부터 신세포 보호효과 측정

(1) 세포주 선택 및 배양

Canine renal proximal tubular epithelium에서 기원한 MDCK cell을 10% fetal bovine serum, 4.5mM의 glucose, 100IU/mL의 penicillin 및 100IU/mL의 streptomycin이 포함된 Dulbecco modified Eagle medium (DMEM, Gibco™, USA)에서 배양하였다.

(2) 실험방법

(가) MDCK 세포에 다양한 농도의(0, 16, 32, 64, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 μ M)의 수산을 첨가한 후 72시간동안 세포를 배양하였다. MTT 용액을 가하고, 4시간동안 배양하고 dimethyl sulfoxide를 투여한 후 OD₅₄₀을 측정하였다. 모든 MTT 분석법은 8회 반복하여 측정하였으며 측정치는 평균±표준편차로 표시하였고 통계 처리는 ANOVA법을 사용하였다.

(나) 또한, MDCK cell을 다양한 농도의(0, 16, 32, 64, 125, 250, 500, 1000 μ g/mL) 將軍茶 우전, 세작 추출물 원액을 배지에 첨가하여 세포를 배양한 후 MTT 용액을 가한 후, 4시간동안 배양하고 dimethyl sulfoxide를 투여한 후 OD₅₄₀을 측정하였다. MDCK cell을 1mM 농도의 수산 나트륨으로 처리한 후, 다양한 농도의(0, 10, 25, 50 μ g/mL) 將軍茶 세작 추출물을 배지에 첨가하였다. 24, 48, 72시간동안 세포를 배양한 후 MTT 용액을 가한 후, 4시간동안 배양하고 dimethyl sulfoxide를 투여한 후 OD₅₄₀을 측정하였다.

나. 신장병 동물모델계에 있어서 將軍茶의 신장보호효과 규명

(1) 실험 동물 및 식이

체중 100-150 g의 Sprague Dawley 흰쥐를 5군으로 나누었다(n=40). 모든 동물은 chow를 섭취하였다. 대조군을 제외한 제2군-제5군은 신손상군으로 2.5% 수산이 포함된 식이와 제1일부터 8일간 하루에 1회씩 40 mg/kg의 gentamycin을 피하주사하여 신손상을 유도하였다. 1L의 100℃ 물에 將軍茶 세작 또는 황차를 넣고 10분간 저어서 우려낸 다음 각각 3군과 4군에게 음용하게 하였고, 제5군은 동결건조한 생잎가루를 식이에 5% 포함하여 30일간 제공하였다.

(2) 실험 방법

식이 시작 30일째에 metabolic cage를 이용하여 24시간 동안 소변을 수집한 후, 24시간 요량과 요산도 등 일반적 성상을 조사하며, 신기능의 정도를 알기 위하여 creatinine 청소율을 측정하였다. 신손상 정도를 평가하기 위해 24시간 요에서 근위신세뇨관 상피세포의 brush border 효소인 gamma glutamyl transpeptidase(GGT)와 lysosomal enzyme인 n-acetyl gulcosaminidase(NAG)를 효소화학법으로 검출하고 요단백질을 정량하였다. 신장 조직의 손상을 형태학적으로 관찰하기 위하여, 동물을 50 mg/kg의 nembutal로 마취시킨

후 정중절개를 통하여 대동맥을 노출시킨 후 대동맥을 통하여 pH 7.4, 0°C Krebs Ringer Bicarbonate(KRB)용액 10mL를 신장에 관류시킨 후 신장을 절제하였다. 신장을 0°C KRB용액이 담긴 비이커에서 증으로 이분 후 해부현미경하에서 포르말린에 담가 고정시킨 후 파라핀 블록을 제조하였다. 파라핀 블록을 깎아내고 H & E 염색을 시행하여 광학 현미경으로 신장을 관찰하였다.

다. 제2형 당뇨동물모델에 있어서 將軍茶의 糖尿病性 腎症 개선효과 및 신장 보호효과 규명

(1) 실험 동물 및 식이 방법

생후 4주령의 수컷 C57BL/Ks db/db mouse를 3군으로 나누어, 대조군(제1군)에게는 AIN-93G 식이를 제공하면서, 제2군은 황차, 제3군은 생잎 가루를 각각 식이의 5% 수준으로 첨가하여 14주간 제공하였다.

(2) 실험동물의 소변 및 혈액 성분 분석

식이 시작 14주 후 24시간 urine을 채취하고 urine volume을 측정하였다. 신기능 정도를 알기 위하여 creatinine clearance를 측정하였다. 이는 24시간 요검사에서 요중 크레아티닌치와 혈중 크레아티닌치를 측정하여 24시간 뇨량으로부터 아래의 공식에 따라 구하였다.

$$\text{GFR (mL/min)} = (\text{요중 Cr/혈중 Cr}) \times 24\text{시간 뇨량(mL)} / 1440(\text{min})$$

요중 ketone체, protein, albumin 농도, pH를 측정하였고, GGT와 NAG를 효소화학법으로 검출하며, 혈장 BUN, creatinine, albumin 농도를 측정하였다.

(3) 적출한 신조직 분석

신손상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 해부현미경 및 전자현미경하에서 신장의 hypertrophy 및 mesangial matrix expansion 등 신장 변화를 관찰하였다. 동물의 신장조직을 수거하여 파쇄하고, 상층액을 취하여 TBARS용액을 첨가하여 반응시켜 지질과산화물 농도를 측정하였다. Glutathione 농도는 Richardson과 Murphy 등의 방법을 이용하여 측정하였다. 신장조직의 SOD 및 catalase, GSH-px 활성을 측정하였다.

라. 제2형 당뇨동물 모델계에 있어서 將軍茶음료의 糖尿病性 腎症 개선 효과 규명

(1) 실험 동물 및 식이

생후 4주령의 수컷 C57BL/Ks db/db mouse 15마리를 구입하여 1주일간의 적응 기간이 끝난 후 난괴법에 따라 각각 대조군(n=7)과 將軍茶음료군(n=8)의 2군으로 나누었다. 대조군에게는 일반 식수를 제공하였으며, 將軍茶음료군에게는 제2세부과제에서 제공받은 將軍

茶음료 시제품을 *ad libitum*으로 제공하였으며, 식이는 모두 AIN-93G 식이를 동일하게 제공하였다. 2세부과제에서 개발한 將軍茶음료를 제공받아 동물에게 섭취시켰다.

(2) 실험 방법

매주 실험동물의 섭취량, 음수량 및 체중을 측정하였다. 실험동물의 血糖 정도를 관찰하기 위하여 6주와 12주 경과 후 血糖을 측정하였다. 糖尿病性 腎症의 개선 효과를 확인하기 위하여 12주간의 식이 섭취 후 metabolic cage를 사용하여 24시간 소변을 1주일 간격으로 3회 모아서 將軍茶음료의 섭취에 따르는 urine volume, 24시간 소변 중 albumin, creatinine 등을 측정하였다. 14주째 실험동물의 혈액을 채취하여 혈중 BUN, creatinine, electrolyte 등과 creatinine clearance를 측정하였으며, 심장채혈법으로 희생시킨 후 양측 신장을 적출하고 지방 조직을 제거한 후 신장의 무게를 측정하였다.

(3) 적출한 신조직 분석

동물의 신장조직을 수거하여 파쇄하고, 상층액을 취하여 TBARS용액을 첨가하여 반응시켜 지질과산화물 농도를 측정하였다. 신장조직의 SOD 및 catalase, GSH-px 활성을 측정하였다.

마. 제2형 당뇨병환자에 있어서 將軍茶음료 시제품의 신장 보호효과 확인

(1) 환자 선별 및 디자인

20인의 제2형 당뇨병환자를 대상으로 將軍茶음료의 糖尿病 개선효과를 규명하였다. 당뇨병환자 20인을 두 군으로 나누어 시험군은 2세부과제에서 개발한 將軍茶음료를 12주간 200mL(1컵)씩 총 2회 음용하고, 대조군은 동일한 양의 placebo 섭취하도록 하였다. 시험은 제1세부과제와 연계하여 실시하였다.

(2) 소변 및 혈액 분석

시험기간 전과 후에 환자의 24시간 소변을 수집하였고 공복상태의 혈액을 채취하였다. 뇨의 microalbumin을 radioimmunoassay로 측정하였고, 뇨중 Na, K 농도를 측정하였고, 혈청의 Na, K, BUN, creatinine 농도, BUN을 측정하여 신기능 개선도를 조사하였다. GFR(사구체여과율)은 Modification of Diet in Renal Disease (MDRD II) 공식에 의해 Cr-based GFR를 아래와 같이 계산하였다(Levey *et al.*, 1999).

$$\begin{aligned} \text{Cr-based GFR (mL/min/1.73 m}^2\text{)} \\ = 186 \times (\text{Scr})^{-1.154} \times (\text{Age})^{-0.203} \times 0.742 \text{ (for a female patient)} \times 1.212 \text{ (for a black patient)} \end{aligned}$$

(3) 혈압, 혈액 지질과산화물 및 항산화능 측정

시험기간 전과 후에 환자의 혈압을 측정하였고, 혈청의 지질과산화물 함량은 Ohkawa 등의 방법(1979)을 이용하여 thiobarbituric acid(TBA)와 반응하는 malondialdehyde(MDA)의 함량을 측정하였고, 표준용액으로는 1,1,3,3-tetramethoxypropane(TMP)을 사용하였다. 적혈구 SOD 활성은 pyrogallol의 자동산화를 억제하는 SOD의 antioxidant capacity를 측정하

였다. Catalase 활성은 적혈구를 hydrogen peroxide로 처리한 후 hydrogen peroxide의 감소량을 측정하여 구하였다. Glutathione peroxidase 활성은 Lawrence와 Burk의 방법(1976)을 이용하여, t-butylhydroperoxide에 의해 glutathione을 산화시킨 후, 산화된 glutathione이 glutathione reductase와 NADPH의 존재하에 다시 glutathione으로 환원될 때 감소된 NADPH 농도를 측정하여 구하였다.

바. 將軍茶의 糖尿病性 腎症 개선 메커니즘 규명

(1) 세포고사 억제에 의한 糖尿病性 腎症 개선 효과 확인

(가) 세포주 선택 및 배양

MDCK cell을 사용하여 제2세부과제에서 음료 시제품 제조에 사용한 將軍茶 활성성분의 糖尿病性 腎症 개선 메커니즘을 규명하였다. 상기세포주를 10% fetal bovine serum, 4.5mM의 glucose, 100IU/mL의 penicillin 및 100IU/mL의 streptomycin이 포함된 Dulbecco modified Eagle medium (DMEM, Gibco™, USA)에서 배양하였다.

(나) 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

MDCK cell을 96-well plate에서 70-80%의 confluence를 보이는 정도로 배양하였다. 이후 1mM의 sodium oxalate 및 다양한 농도의 중작 將軍茶 추출물(0, 10, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 넣고 24시간동안 배양한 후 MTT 용액을 가하고 4시간 배양한 후 dimethyl sulfoxide를 투여한 후 OD₅₄₀을 측정하였다. 측정된 OD₅₄₀을 사용하여 viable cell의 relative fraction을 계산하였다.

(2) 항산화효과에 의한 糖尿病性 腎症 개선 효과 확인

MDCK cell에 있어서 將軍茶 활성성분의 항산화효과를 Malondialdehyde (MDA) assay로 측정하였다. MDCK cell을 6-well plate에서 70-80%의 confluence를 보이는 정도로 배양하였다. 이후 1mM 농도의 sodium oxalate로 처리하고, 500U/mL superoxide dismutase, 300U/mL catalase, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 將軍茶 중작 추출물을 배지에 첨가한 후, 정해진 시간 간격(0, 30, 60, 120분)에 따라 배지를 제거하고 PBS로 3번 세척 후 세포를 수거하여 sonication으로 세포를 파괴한 뒤에 세포 lysate에 TBARS용액을 가하여 반응시키고 OD₅₃₂을 측정하였다.

제 4 절 연구개발 수행결과

1. 장군차의 혈당조절효과 규명 및 임상적용

가. 식후 血糖조절 효과 및 포도당 수송 개선효과

(1) *In vitro*에서 탄수화물 소화효소 저해활성

*In vitro*에서 將軍茶 및 녹차 메탄올 추출물(0.5 mg/mL)의 yeast α -glucosidase 저해활성을 측정된 결과, 將軍茶 세작(54.0%)의 저해활성이 가장 높았고, 將軍茶 우전(51.1%), 將軍茶 생잎(47.8%), 시판 녹차(우전, 47.2%), 將軍茶 황차(45.7%) 순으로 나타나, 모두 糖尿病 치료제로 사용되고 있는 α -glucosidase 저해제인 acarbose(39.7%)보다 높게 나타났다(Fig. 1). α -Glucosidase는 식이 중의 탄수화물을 소화시키는 효소로, acarbose와 같은 α -glucosidase 저해제는 당뇨병에 있어서 식후血糖을 감소시키고, 공복血糖 조절효과도 우수한 것으로 알려져 있어 경구血糖 강하제로 사용되고 있다.

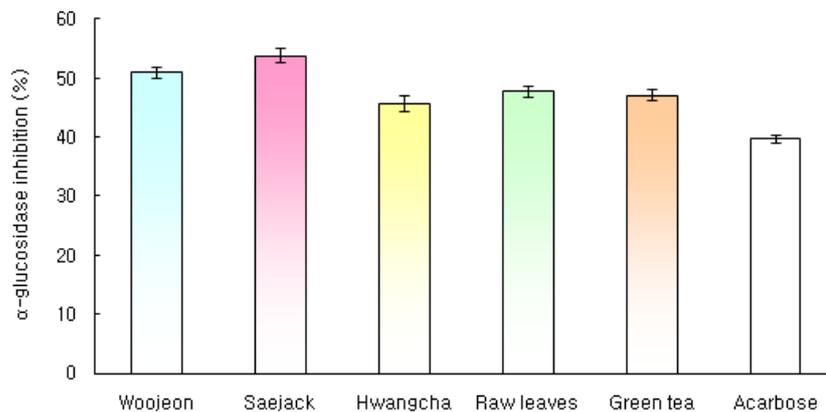


Fig. 1. α -Glucosidase inhibitory activities of methanol extracts of *Jangguncha*.

將軍茶 메탄올 추출물(0.5 mg/mL)의 α -amylase 저해활성을 측정된 결과, 將軍茶 황차 (23.6%)의 저해활성이 가장 높았고, 將軍茶 세작(22.6%), 녹차(20.4%), 將軍茶 우전(19.8%), 將軍茶 생잎(18.3%) 순으로 나타났으며, acarbose의 저해활성은 63.5%로 나타났었다(Fig. 2). 將軍茶 메탄올 추출물의 α -amylase 저해활성은 acarbose 대비 28.8-37.2% 수준으로 나타났었다.

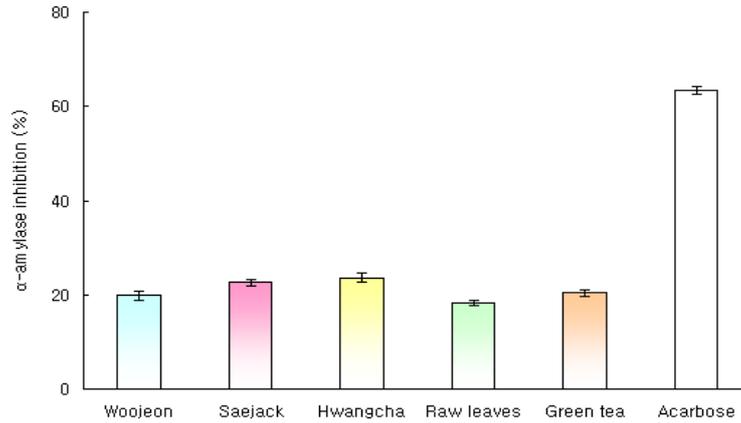


Fig. 2. α-Amylase inhibitory activities of methanol extracts of *Jangguncha*.

(2) 당뇨 동물모델계에 있어서 식후血糖 저하 효과

대조군의 경우 전분 투여 90분 후에 식후血糖이 최고치에 도달하였다(Fig. 3). 세작, 황차 및 생잎 추출물을 투여한 경우, 대조군에 비해 식후 30분, 60분, 90분($p < 0.01$), 180분의 식후血糖 증가치가($p < 0.05$) 유의적으로 감소하였다.

식후血糖 증가곡선의 면적은 대조군, 세작군, 황차군, 생잎군이 각각 $16,068 \pm 2,887$, $9,168 \pm 1,789$, $9,443 \pm 2,152$, $7,642 \pm 1,587$ mg · min/dL로 나타나, 세작군, 황차군, 생잎군 모두 대조군에 비해 유의적으로 감소한 것으로 나타났다($p < 0.01$, Table 2). 따라서 將軍茶 세작, 황차 및 생잎 추출물은 *in vitro*에서 α-glucosidase 및 α-amylase 저해활성을 나타내고, *in vivo*에서도 식후 血糖 저해활성이 우수한 것으로 나타나, 장기간 섭취시 糖尿病 개선효과가 기대된다.

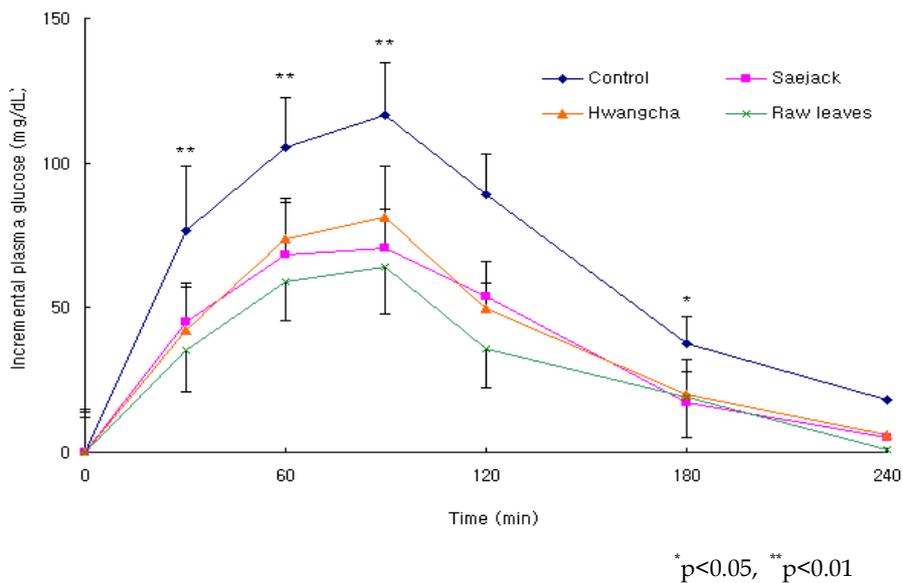


Fig. 3. Postprandial plasma glucose responses of streptozotocin-induced diabetic rats.

Table 2. Area under the postprandial glucose response curves(AUC)

Group	AUC (mg · min/dL)
Control	16,068±2,887**
<i>Saejack</i>	9,168±1,789
<i>Hwangcha</i>	9,443±2,152
Raw leaves	7,642±1,587

** p<0.01

(3) 세포모델계에 있어서 말초조직의 포도당 수송(glucose transport) 개선 효과

3T3-L1 세포에 있어서 將軍茶 우전, 세작, 황차, 생잎 및 녹차 추출물이 세포생존률에 미치는 영향을 Fig. 4에 나타내었다. 세포생존률은 농도 의존적으로 감소하였다. 將軍茶 우전, 세작, 황차, 생잎 및 녹차 추출물의 IC₅₀는 각각 50.0 µg/mL, 57.7 µg/mL, 55.3 µg/mL, 33.5 µg/mL, 32.0 µg/mL으로 나타났다(Fig. 4).

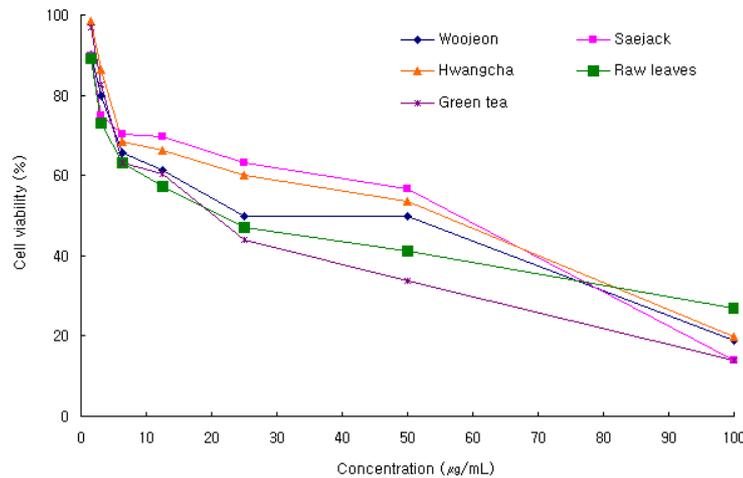


Fig. 4. Cytotoxicity of methanol extracts of *Jangguncha* in 3T3-L1 cells.

將軍茶 우전, 세작, 황차, 생잎 및 녹차 추출물의 3T3-L1 세포에서의 glucose uptake에 미치는 영향은 Fig. 5에 나타내었다. 將軍茶 우전, 세작, 황차, 생잎 및 녹차 추출물을 10 µg/mL 처리한 경우, 추출물을 처리하지 않은 대조구 대비 glucose uptake가 122.6±5.58%, 129.6±6.9%, 120.1±3.8%, 118.4±2.5%, 133.3±7.6%로 나타나, 대조군보다 유의적으로 높게 나타났다(p<0.05). 제2형 糖尿病 환자는 인슐린저항성을 나타내며 식후 血糖이 증가한다. Glucose uptake의 증가는 포도당의 조직내 이용률을 증가시켜 인슐린저항성을 개선시킬 수 있다(Park *et al.*, 2008). 將軍茶 추출물은 대조구 보다 유의적으로 glucose uptake를 증가시켜, 인슐린 저항성을 개선시키고 식후 血糖조절에 효과를 나타내는 것으로 사료된다. 지속적인 식후 血糖조절은 공복血糖을 감소시킬 수 있으므로 당뇨치료에 도움이 될 것으로 기대된다.



Fig. 5. The effect of extracts of *Jangguncha* on glucose uptake in 3T3-L1 cells.

나. 당뇨동물 모델에 있어서 將軍茶의 糖尿病 개선효과

(1) 將軍茶의 일반성분

세작, 황차, 생잎의 단백질 함량은 각각 34.3%, 20.7%, 19.2%로 나타났고, 식이섬유 함량은 각각 27.1%, 48.5%, 45.8%로 나타났다(Table 3).

Table 3. Composition of *Saejack*, *Hwangcha* and raw leaves

	<i>Saejack</i> (g)	<i>Hwangcha</i> (g)	Raw leaves (g)
Water	5	7.3	2.8
Fat	1.3	2.1	3.8
Protein	34.3	20.7	19.2
Ash	4.8	5.2	6.0
Dietary fiber	27.1	48.5	45.8

제2형 당뇨 동물모델에게 세작, 황차, 생잎분말이 5% 함유된 식이를 6주간 섭취시킨 결과 체중은 대조군보다 유의적으로 낮았다($p<0.05$, Table 4). 세작군, 생잎군의 체중증가량은 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났으나($p<0.05$), 황차군은 대조군과 유의적 차이가 없었으며, 세작군, 생잎군과도 유의적 차이가 없었다. 대조군과 세작군, 황차군, 생잎군의 식이섭취량은 유의적인 차이가 없었다. 반면 식이섭취효율(feed efficiency ratio, FER)은 세작군, 생잎군이 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다($p<0.05$, Table 5). 부고환지방 무게의 경우 세작군, 황차군, 생잎군이 대조군에 비해 유의적으로 작게 나타났다. 세작군, 황차군, 생잎군 사이의 부고환지방 무게는 유의적인 차이가 없었다. 세작, 황차, 생잎추출물은

*in vitro*에서 α -glucosidase 저해활성을 나타내었고, acarbose와 같은 α -glucosidase 저해제를 장기간 섭취한 경우, 체중감소 효과가 있다고 보고되었다.

Table 4. Body weight and epididymal fat pad weight in db/db mice

Group	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Epididymal fat pad weight (g)
Control	24.4±1.2	41.3±2.5 ^{a*}	2.0±0.1 ^a
<i>Saejack</i>	23.7±1.0	34.8±3.1 ^b	1.6±0.2 ^b
<i>Hwangcha</i>	22.7±1.4	35.5±4.2 ^b	1.7±0.2 ^b
Raw leaves	23.0±1.6	34.4±3.6 ^b	1.6±0.1 ^b

* p<0.05

Table 5. Weight gain, food intake and FER in db/db mice

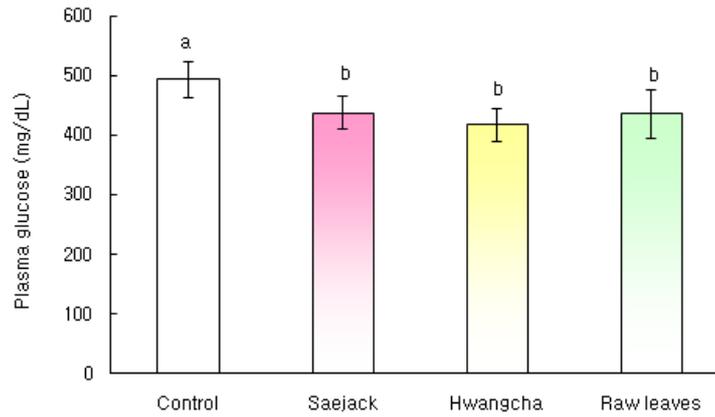
Group	Weight gain (g/d)	Food intake (g/d)	FER* (%)
Control	0.40±0.05 ^a	4.0±0.3	10.1±1.6 ^a
<i>Saejack</i>	0.26±0.06 ^b	3.7±0.5	7.1±1.4 ^b
<i>Hwangcha</i>	0.30±0.09 ^{ab}	3.9±0.6	7.8±1.5 ^{ab}
Raw leaves	0.27±0.07 ^b	3.7±0.2	7.4±2.0 ^b

*Feed efficiency ratio = (Weight gain/food intake) X 100

* p<0.05

(2) 血糖개선 효과

Db/db mouse에게 세작, 황차, 생잎을 5% 함유한 식이를 6주간 공급한 후 공복 血糖을 측정한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 세작군, 황차군, 생잎군의 공복 血糖은 각각 437.7±27.3 mg/dL, 417.7±26.7 mg/dL, 436.3±39.7 mg/dL로 나타나, 대조군(494.2±29.9 mg/dL)에 비해 유의적으로 감소하였다(p<0.05, Fig. 6).



p<0.05

Fig. 6. Effect of Saejack, Hwangcha and raw leaves on fasting plasma glucose levels in db/db mice.

대조군, 세작군, 황차군, 생잎군의 혈장 인슐린 농도는 각각 4.53 ± 0.74 ng/mL, 3.75 ± 0.48 ng/mL, 3.93 ± 0.64 ng/mL, 4.00 ± 0.38 ng/mL로 나타나, 4군 간에 유의적인 차이가 없었다 (Fig. 7).

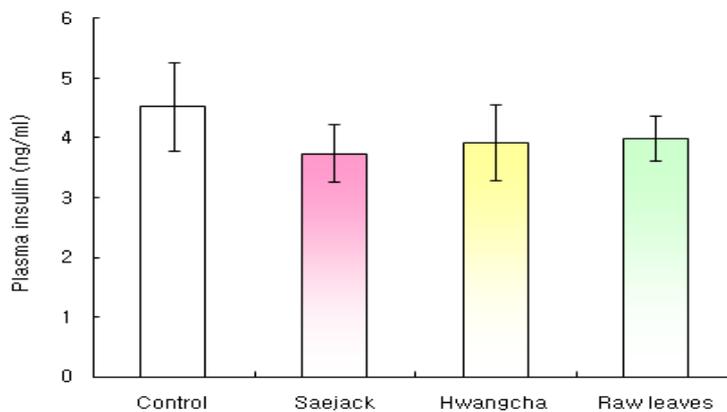


Fig. 7. Effect of Saejack, Hwangcha and raw leaves extracts on the levels of plasma insulin in db/db mice.

세작군, 황차군, 생잎군의 당화헤모글로빈 농도는 각각 $6.65 \pm 0.60\%$, $6.32 \pm 0.44\%$, $6.05 \pm 0.59\%$ 로 나타나, 대조군($7.31 \pm 0.49\%$)에 비해 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$, Fig. 8). 당화헤모글로빈 농도는 장기간의 血糖 조절 정도를 나타내는 중요한 지표이다. 따라서 將軍茶는 糖尿病의 가장 중요한 목표인 血糖 조절에 도움이 되는 것으로 사료된다.

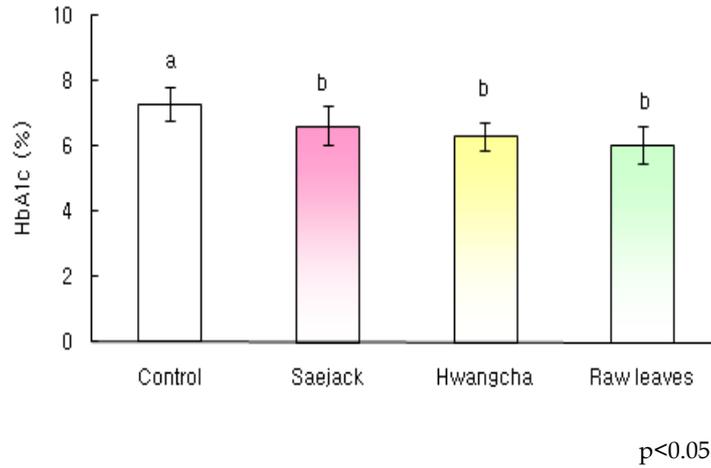


Fig. 8. Effect of *Saejack*, *Hwangcha* and raw leaves on the levels of HbA_{1c} in db/db mice.

(3) 지질대사 개선효과

Db/db mouse에게 세작, 황차, 생잎을 장기간 섭취시켜 혈장 중성지방 농도를 측정한 결과는 Fig. 9에 나타내었다. 세작군, 황차군, 생잎군의 혈장 중성지방 농도는 각각 108.6 ± 17.8 mg/dL, 104.9 ± 11.7 mg/dL, 110.5 ± 13.4 mg/dL로 나타나, 대조군 (134.8 ± 14.9 mg/dL)에 비해 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$, Fig. 9).

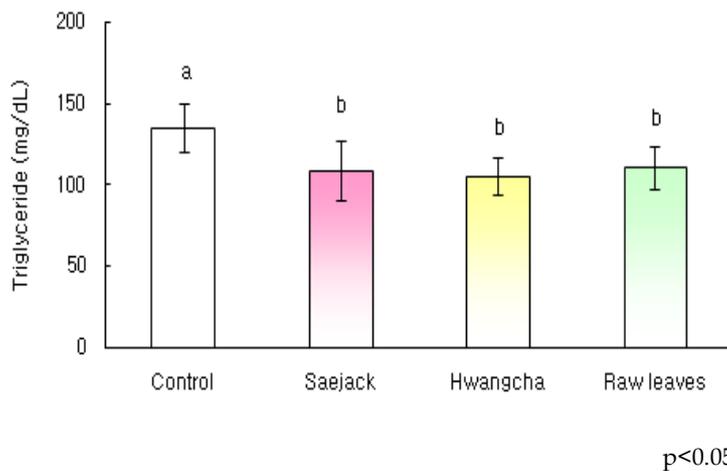
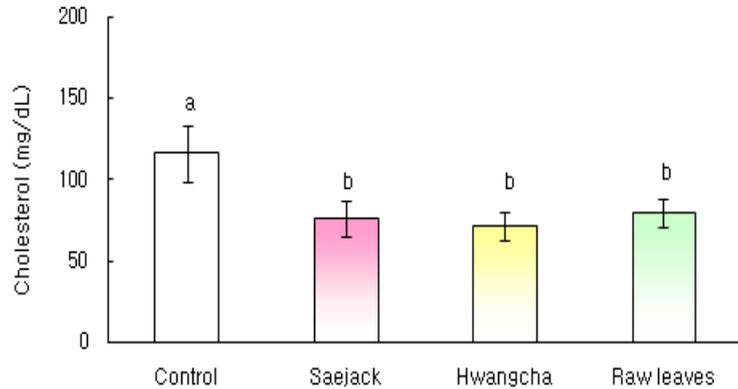


Fig. 9. Effect of *Saejack*, *Hwangcha* and raw leaves on plasma triglyceride levels in db/db mice.

세작군, 황차군, 생잎군의 총 콜레스테롤 농도는 각각 76.1 ± 11.1 mg/dL, 71.3 ± 9.0 mg/dL, 79.2 ± 8.9 mg/dL로 나타나 대조군(115.9 ± 17.5 mg/dL)에 비해 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.01$, Fig. 10). 당뇨병 환자의 주된 사망요인은 심혈관계 합병증이며, 고지혈증은 심혈관계 합병증의 주요 risk factor이다. 따라서 세작, 황차, 생잎의 섭취는 혈장 중성지방과 콜레스테롤 농도를 저하시켜 심혈관계질환을 포함한 당뇨합병증 예방에 도움이 되는 것으로 사료된다.



p<0.01

Fig. 10. Effect of *Saejack*, *Hwangcha* and raw leaves on plasma total cholesterol levels in db/db mice.

대조군, 세작군, 황차군, 생잎군의 HDL-콜레스테롤 농도는 각각 27.3±7.9 mg/dL, 28.8±6.0 mg/dL, 28.2±5.3 mg/dL, 29.3±6.0 mg/dL으로 나타나, 4군 간에 유의적인 차이가 없었다 (Fig. 11).

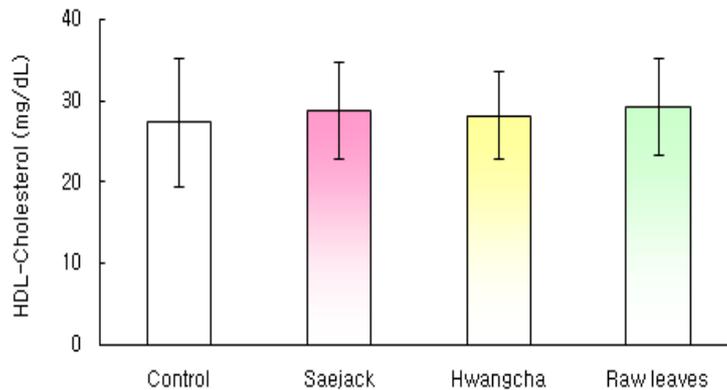


Fig. 11. Effect of *Saejack*, *Hwangcha* and raw leaves on plasma HDL-cholesterol levels in db/db mice.

(4) 소장점막의 탄수화물 소화효소 활성

공복시 소장 점막의 α -amylase 활성은 세작군, 황차군, 생잎군이 각각 0.96±0.35 U/mg protein, 0.96±0.26 U/mg protein, 0.13±0.25 U/mg protein로 나타나 대조군(1.25±0.19 U/mg protein)에 비해 유의적인 차이가 없었다(Table 6). 세작군, 황차군, 생잎군의 maltase 활성은 각각 257.0±17.0 U/g protein, 249.3±24.0 U/g protein, 253.5±17.3 U/g protein으로 나타나, 대조군(294.8±31.1 U/g protein)에 비해 유의적으로 감소하였다 (p<0.05). 소장의 sucrase 활성은 대조군(178.3±26.4 U/g protein), 세작군(163.3±21.9 U/g

protein), 황차군(167.3±24.0 U/g protein) 및 생잎군(157.8±28.3 U/g protein) 간에 유의적인 차이가 없었다(Table 6). α-Glucosidase 저해활성이 우수한 세작, 황차, 생잎을 장기간 섭취한 경우, 소장의 maltase 활성이 감소되었으며, 이러한 현상은 血糖 조절에 도움을 줄 것으로 사료된다.

Table 6. Activities of α-amylase, maltase, and sucrase of control, *Saejack*, *Hwangcha*, and raw leaves groups

Group	α-Amylase (U/mg protein)	Maltase (U/g protein)	Sucrase (U/g protein)
Control	1.25±0.19	294.8±31.1 ^a	178.3±26.4
<i>Saejack</i>	0.96±0.35	257.0±17.0 ^b	163.3±21.9
<i>Hwangcha</i>	0.96±0.26	249.3±24.0 ^b	167.3±24.0
Raw leaves	0.13±0.25	253.5±17.3 ^b	157.8±28.3

p<0.05

(5) 간조직 GLUT4의 gene expression

將軍茶의 장기간 섭취가 간 조직 glucose transporter(GLUT4)의 gene expression에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 12에 나타내었다. 세작군, 황차군, 생잎군의 GLUT4 mRNA expression은 각각 208.3±14.7%, 170.0±17.9%, 191.7±11.7%로 나타나 대조군에 비해 유의적으로 증가되었다(p<0.01, Fig. 12). 따라서 세작, 황차, 생잎은 GLUT4 mRNA expression을 증가시켜, 血糖 개선에 기여하는 것으로 사료된다.

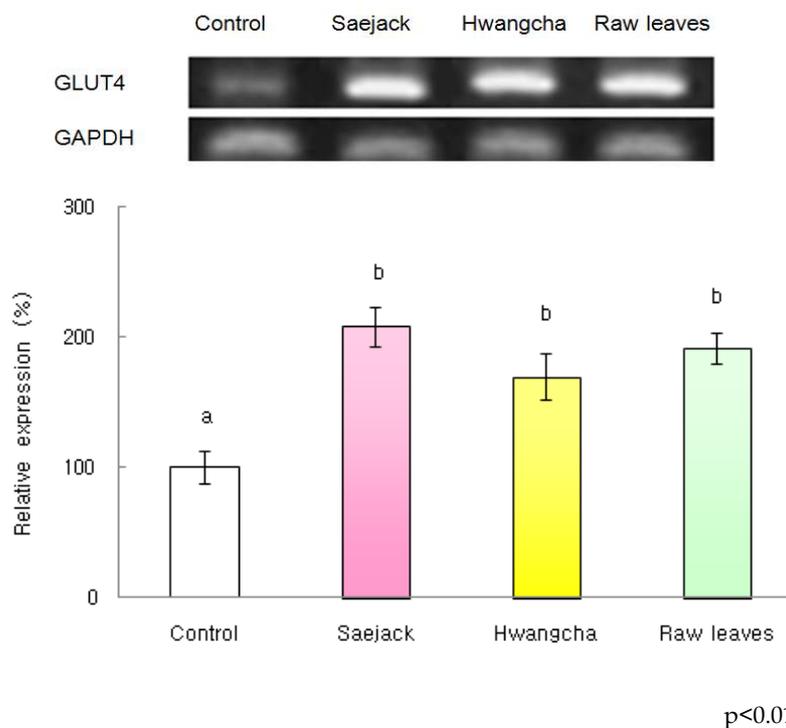


Fig. 12. Effect of *Saejack*, *Hwangcha* and raw leaves on mRNA expression of GLUT4 of liver in db/db mice.

(6) 간조직의 지질과산화물 농도 및 항산화 효소계 활성

간조직의 지질과산화물 농도를 측정된 결과 세작군, 황차군, 생잎군이 각각 5.9 ± 1.3 nmol MDA/mg protein, 5.2 ± 1.7 nmol MDA/mg protein, 5.4 ± 1.9 nmol MDA/mg protein으로 대조군(9.4 ± 2.1 nmol MDA/mg protein)에 비하여 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$, Fig. 13).

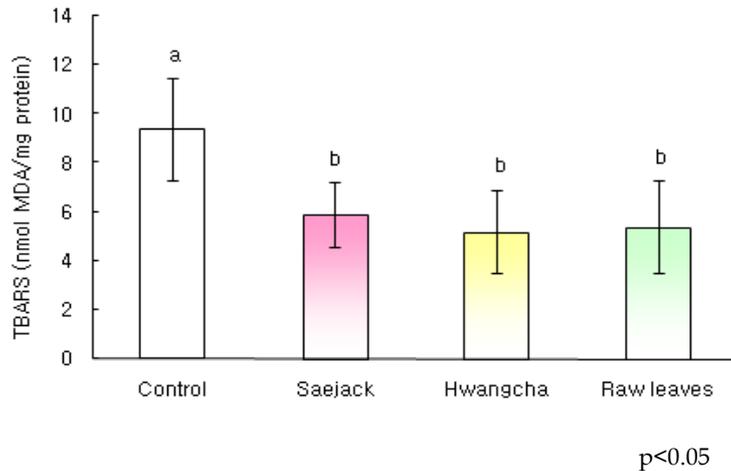


Fig. 13. Effect of Saejack, Hwangcha and raw leaves on hepatic TBARS levels in db/db mice.

세작군, 황차군, 생잎군의 간조직 SOD 활성은 각각 36.5 ± 2.4 U/mg protein, 37.9 ± 3.5 U/mg protein, 40.5 ± 3.1 U/mg protein으로 나타나, 대조군(30.2 ± 2.4 U/mg protein)에 비하여 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$, Table 7). Catalase 활성은 대조군, 세작군, 황차군, 생잎군이 각각 23.0 ± 1.7 , 28.9 ± 3.0 , 24.4 ± 3.7 , 29.1 ± 3.4 U/mg protein으로 나타나, 세작군, 생잎군이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 糖尿病의 경우 산화적 스트레스가 증가하고, 과산화는 당뇨合併症을 악화시킨다. 將軍茶의 섭취는 지질과산화물을 감소시키고, 항산화 효소계 활성을 증가시켜 당뇨合併症 예방에 도움이 될 것으로 사료된다.

Table 7. Effect of Saejack, Hwangcha and raw leaves on hepatic SOD and catalase activities in db/db mice

Group	SOD (U/mg protein)	Catalase (U/mg protein)
Control	30.2 ± 2.4^a	23.0 ± 1.7^a
Saejack	36.5 ± 2.4^b	28.9 ± 3.0^b
Hwangcha	37.9 ± 3.5^b	24.4 ± 3.7^{ab}
Raw leaves	40.5 ± 3.1^b	29.1 ± 3.4^b

$p < 0.05$

다. 마우스에 있어서 將軍茶의 단기 안전성

(1) 사망률 및 임상증상

將軍茶 주정추출물을 농도별로 ICR 마우스(male 40, female 40)에게 7일간 경구투여 하는 동안 대조군 및 시험군에 있어서 사망동물은 관찰되지 않았다(Table 8). 임상증상을 관찰한 결과 대조군, 0.25, 0.5, 1 및 2 g/kg 투여군에서 추출물 투여로 인한 이상증상은 관찰되지 않았다. 본 연구에서는 경구 독성투여 한계용량인 2 g/kg 투여군에 있어서 이상증상을 나타내지 않았다. 따라서 將軍茶 추출물은 독성을 나타내지 않는 것으로 사료된다.

Table 8. Mortality in mice administrated orally with the fermented alcohol extracts of *Jangguncha* for 7 days

Sex	Dosage (g/kg)	Day								Final mortality
		0	1	2	3	4	5	6	7	
Male	0	0/10 ¹⁾	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	0.25	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	0.5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	1.0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	2.0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Female	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	0.25	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	0.5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	1.0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	2.0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

¹⁾Values are expressed as animal numbers (cumulative mortality number of mouses/total number of mouses).

(2) 체중

시험기간 동안 각 군의 체중변화를 측정한 결과 대조군 및 농도별 將軍茶 주정추출물군의 체중이 증가하였으며, 각 군간의 유의적 차이는 없었다. 따라서 將軍茶 주정추출물의 체중 변화에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Table 9).

Table 9. Body weight changes in mice administrated orally with the fermented alcohol extracts of *Jangguncha* for 7 days

Sex	Dosage (g/kg)	Days after treatment		Body weight Gain
		0	7	
Male	0	34.9±1.9	37.3±1.9	2.4±0.2
	0.25	34.9±2.7	37.3±3.0	2.5±0.5
	0.5	36.2±0.9	38.3±1.2	2.4±0.5
	1.0	35.4±0.7	38.0±1.0	2.6±0.4
	2.0	35.5±1.5	38.1±1.8	2.5±0.4
Female	0	26.2±1.1	28.4±1.2	2.4±0.3
	0.25	26.9±0.9	28.8±1.0	2.2±0.2
	0.5	26.9±1.1	29.1±0.9	2.2±0.3
	1.0	26.6±1.1	29.0±1.1	2.4±0.4
	2.0	27.0±1.0	29.2±1.2	2.2±0.3

(3) 장기무게 및 부검 결과

將軍茶 주정추출물을 투여한 결과 대조군 및 투여군 모두 장기의 변화나 추출물 투여로 인한 농도 의존적인 특이할만한 부검소견은 관찰되지 않았다. 간, 신장, 비장, 심장 조직 무게를 측정된 결과 대조군 및 투여군 사이에 유의적인 차이가 없었다(Table 10).

Table 10. Absolute organ weight in mice administrated orally with the fermented alcohol extracts of *Jangguncha* for 7 days

Sex	Dosage (g/kg)	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Heart (g)
Male	0	1.24±0.27	0.40±0.14	0.15±0.03	0.11±0.04
	0.25	1.19±0.15	0.51±0.05	0.14±0.03	0.13±0.02
	0.5	1.35±0.18	0.50±0.04	0.16±0.03	0.12±0.02
	1.0	1.23±0.48	0.45±0.05	0.17±0.03	0.13±0.02
	2.0	1.19±0.21	0.41±0.05	0.15±0.04	0.14±0.01
Female	0	1.09±0.12	0.34±0.06	0.13±0.03	0.10±0.01
	0.25	1.12±0.09	0.37±0.09	0.12±0.02	0.12±0.09
	0.5	1.06±0.17	0.40±0.11	0.13±0.03	0.12±0.04
	1.0	1.10±0.13	0.37±0.16	0.12±0.06	0.14±0.06
	2.0	1.03±0.08	0.30±0.03	0.14±0.03	0.11±0.05

(4) 혈액 hematology

將軍茶 주정추출물을 7일간 투여한 후 혈액 중의 백혈구, 적혈구, 헤모글로빈, hematocrit, blood platelet, MCV, MCH 및 MCHC를 측정한 결과 모든 군에서 유의적인 차이가 없었다(Table 11). 따라서 將軍茶 추출물은 혈액 hematology에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다.

Table 11. Hematological values in mice administrated orally with the fermented alcohol extracts of *Jangguncha* for 7 days

Sex	Dosage (g/kg)	WBC ¹⁾ (Thous/ μ L)	RBC (M/ μ L)	Hb (g/dL)	HCT (%)	Platelet (Thous/ μ L)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (%)
Male	0	4.3 \pm 0.6	8.8 \pm 0.4	14.6 \pm 0.7	45.5 \pm 2.3	1702.4 \pm 155.6	51.9 \pm 0.9	16.6 \pm 0.2	32.1 \pm 0.5
	0.25	4.2 \pm 0.3	8.7 \pm 0.3	14.4 \pm 0.4	45.7 \pm 1.8	1775.6 \pm 147.1	52.8 \pm 1.7	16.7 \pm 0.4	31.6 \pm 1.1
	0.5	4.3 \pm 0.3	9.0 \pm 0.4	14.9 \pm 1.3	46.8 \pm 3.3	1730.4 \pm 332.7	51.4 \pm 1.3	16.4 \pm 0.5	31.8 \pm 0.8
	1.0	4.2 \pm 0.2	8.7 \pm 0.9	14.1 \pm 1.8	44.2 \pm 5.9	1702.8 \pm 395.5	51.4 \pm 2.0	16.8 \pm 0.2	32.6 \pm 1.5
	2.0	4.1 \pm 1.1	8.5 \pm 0.8	14.1 \pm 1.3	44.6 \pm 3.3	1803.8 \pm 199.1	51.7 \pm 0.8	16.7 \pm 0.1	32.3 \pm 0.5
Female	0	4.5 \pm 0.5	8.1 \pm 0.7	13.8 \pm 1.3	42.3 \pm 4.7	1487.2 \pm 497.0	52.2 \pm 1.8	17.0 \pm 0.4	32.7 \pm 0.5
	0.25	4.7 \pm 3.6	8.3 \pm 0.9	14.2 \pm 1.3	41.6 \pm 4.1	1114.6 \pm 182.1	50.1 \pm 1.2	17.1 \pm 0.3	34.1 \pm 0.4
	0.5	5.1 \pm 0.8	8.5 \pm 0.7	13.5 \pm 2.4	40.8 \pm 67.9	1487.7 \pm 288.4	50.7 \pm 0.5	16.8 \pm 0.2	33.3 \pm 0.4
	1.0	4.8 \pm 1.0	8.3 \pm 0.9	14.2 \pm 1.2	41.7 \pm 4.0	1492.5 \pm 423.5	50.4 \pm 1.8	17.1 \pm 0.3	33.8 \pm 0.9
	2.0	5.1 \pm 0.7	8.7 \pm 0.3	14.7 \pm 0.5	43.9 \pm 1.8	1322.4 \pm 330.6	50.3 \pm 0.7	16.8 \pm 0.3	33.5 \pm 0.7

¹⁾WBC; white blood cell, RBC; red blood cell, Hb; hemoglobin, Hct; hematocrit, MCV; mean corpuscular volume, MCH; mean corpuscular hemoglobin, MCHC; mean corpuscular hemoglobin concentration.

(5) 혈액 생화학적 지표

將軍茶 주정추출물을 7일간 투여한 후 혈액 중의 LDH, GOT, GPT 활성 및 血糖, 총 단백 질, BUN, creatinine, 콜레스테롤 및 중성지방 농도를 측정한 결과 모든 군에서 유의적인 차이가 없었다(Table 12, 13). 따라서 將軍茶 추출물은 간기능 및 신장기능 등 혈액 생화학적 지표에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다.

Table 12. Biochemical values in male mice administrated orally with the fermented alcohol extracts of *Jangguncha* for 7 days

	Dosage (g/kg)				
	0	0.25	0.5	1.0	2.0
Total protein (mg/dL)	6.4±0.6	6.0±0.8	6.2±0.5	6.2±0.4	6.3±0.4
LDH (U/L)	480.0±48.3	491.8±55.4	502.8±43.0	495.4±52.4	506.0±66.2
GOT (U/L)	104.8±12.0	105.0±16.8	107.8±15.4	104.0±11.3	107.4±14.5
GPT (U/L)	63.2±8.9	64.6±7.2	62.6±9.4	63.2±6.5	64.2±6.1
BUN (mg/dL)	23.4±1.8	22.4±2.1	23.0±2.5	23.1±3.0	21.4±2.5
Creatinine (mg/dL)	0.59±0.09	0.56±0.08	0.52±0.09	0.58±0.07	0.61±0.10
Glucose (mg/dL)	97.0±5.2	100.6±7.1	100.2±14.1	95.8±6.4	104.0±13.4
Cholesterol (mg/dL)	96.1±7.8	97.7±7.2	98.2±6.1	96.3±9.7	96.8±11.3
Triglyceride (mg/dL)	82.9±1.8	22.4±2.1	23.0±2.5	23.1±3.0	21.4±2.5

Table 13. Biochemical values in female mice administrated orally with the fermented alcohol extracts of *Jangguncha* for 7 days

	Dosage (g/kg)				
	0	0.25	0.5	1.0	2.0
Total protein (mg/dL)	6.4±0.6	6.0±0.8	6.2±0.5	6.2±0.4	6.3±0.4
LDH (U/L)	480.0±48.3	491.8±55.4	502.8±43.0	495.4±52.4	506.0±66.2
GOT (U/L)	104.8±12.0	105.0±16.8	107.8±15.4	104.0±11.3	107.4±14.5
GPT (U/L)	63.2±8.9	64.6±7.2	62.6±9.4	63.2±6.5	64.2±6.1
BUN (mg/dL)	23.4±1.8	22.4±2.1	23.0±2.5	23.1±3.0	21.4±2.5
Creatinine (mg/dL)	0.59±0.09	0.56±0.08	0.52±0.09	0.58±0.07	0.61±0.10
Glucose (mg/dL)	97.0±5.2	100.6±7.1	100.2±14.1	95.8±6.4	104.0±13.4
Cholesterol (mg/dL)	82.9±9.5	79.9±9.2	82.2±6.0	83.1±4.3	79.9±7.8
Triglyceride (mg/dL)	82.9±5	79.9±9.2	82.2±6.0	83.1±4.3	79.9±7.8

라. 제2형 당뇨병환자에 있어서 將軍茶음료의 항당뇨효능

(1) 일반사항 및 신체계측

시험은 제2형 당뇨병환자 20인(남 10인, 여 10인)을 대상으로 실시하였다. 대조군과 將軍茶음료군의 신장, 체중, 체질량지수, 유병기간은 Table 14에 나타내었다. 대조군과 將軍茶음료군의 유병기간은 각각 7.9±3.3년, 8.6±4.0년이었고, sulfonylurea계 경구血糖강하제를 복용하고 있었다.

Table 14. Characteristics of patients with type 2 diabetes mellitus

	Control group	<i>Jangguncha</i> beverage group
Age (yr)	64.6±6.3	61.8±12.7
Duration of diabetes (yr)	7.9±3.3	8.6±4.0
Body weight (kg)	65.1±11.5	60.5±8.7
Height (cm)	158.9±9.2	158.8±6.7
BMI (kg/m ²)	25.6±2.1	24.0±3.2

20인의 당뇨병환자 모두 시험종료 시점까지 시험에 참가하였고, 부작용을 보고한 환자는 없었다. 대조군 및 將軍茶음료군의 신체계측 결과를 Table 15에 나타내었다. 시험 전 將軍茶음료군의 체질량지수는 24.0±3.2 kg/m²이었으며, 12주 후 체질량지수는 23.9±3.3 kg/m²로 시험 전, 후의 차이는 0.1±0.6 kg/m²로 나타났다. 대조군의 경우 시험 전, 후의 체질량지수 차이가 0.4±0.6 kg/m²로 나타나, 대조군과 將軍茶음료군 사이에 유의적인 차이가 없었다. 대조군과 將軍茶음료군 모두 체중, 허리둘레, 체지방이 시험 전, 후에 유의적으로 변화하지 않았다.

Table 15. Anthropometric measurement of control and *Jangguncha* beverage groups

	Control group			<i>Jangguncha</i> beverage group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference ¹
Weight (kg)	65.2±11.5	63.9±11.2	1.3±1.1	60.5±8.7	60.2±8.8	0.3±1.5
BMI (kg/m ²)	25.5±2.3	25.1±2.0	0.4±0.6	24.0±3.2	23.9±3.3	0.1±0.6
Waist circumference (cm)	90.2±8.8	89.6±8.0	0.4±0.6	87.7±8.1	87.1±7.3	0.6±2.6
Body fat (%)	31.4±5.6	30.7±5.8	0.7±1.3	30.7±3.2	29.8±4.0	0.8±1.5

¹Difference between Pre and Post measurement

(2) 血糖 조절 효과

당뇨환자는 혈액 채취 당일에는 혈액을 채취할 때까지 약물을 복용하지 않았다. 12주간의 將軍茶음료 섭취가 血糖 조절에 미치는 영향은 Table 16에 나타내었다. 將軍茶음료군에 있어서, 음료 섭취 전의 공복 血糖은 145.1 ± 19.4 mg/dL이었으나, 섭취 후 유의적으로 감소하여(9.0 ± 7.9 mg/dL, $p < 0.05$) 136.1 ± 25.6 mg/dL로 나타났다. 시험 전 將軍茶음료군의 혈청 인슐린 농도는 19.8 ± 4.3 μ U/mL이었으며, 시험 후 18.9 ± 3.7 μ U/mL로 나타나 시험 전, 후에 유의적인 차이가 없었다. 將軍茶음료 섭취 전의 HOMA-IR은 3.34 ± 1.05 이었으며, 12주의 시험 기간 후, 2.88 ± 0.89 로 유의적으로 감소하였다. 將軍茶음료군의 당화헤모글로빈 농도는 시험 전, 후 각각 $8.1 \pm 1.3\%$, $7.8 \pm 1.4\%$ 로 나타나 시험 후에 감소하는 경향을 나타내었다. 대조군의 경우 血糖, 인슐린, 당화헤모글로빈 농도는 시험 전, 후에 유의적인 차이가 없었다. 將軍茶음료를 12주간 섭취한 경우, 血糖을 감소시키고 인슐린 저항성을 개선시켜 糖尿病 개선효과를 나타내며, 이는 α -glucosidase 저해활성을 가진 catechin의 효능에 기인하는 것으로 사료된다. 장기간의 血糖 조절 지표인 당화헤모글로빈 농도는, 좀 더 장기간 동안 將軍茶음료를 음용할 경우 감소될 것으로 기대된다.

Table 16. Glycemic control of control and *Jangguncha* beverage groups

	Control group			<i>Jangguncha</i> beverage group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference ¹
Serum glucose (mg/dL)	140.0 ± 16.9	134.9 ± 18.5	1.1 ± 5.5	145.1 ± 19.4	136.1 ± 25.6	$9.0 \pm 7.9^{*2}$
Insulin (μ U/mL)	18.8 ± 3.5	18.3 ± 3.3	0.6 ± 2.4	19.8 ± 4.3	18.2 ± 3.7	1.5 ± 2.4
HbA _{1c} (%)	7.6 ± 0.7	7.5 ± 0.7	0.1 ± 0.6	8.1 ± 1.3	7.8 ± 1.4	0.4 ± 0.5
HOMA-IR ³	3.05 ± 0.77	2.94 ± 0.69	0.12 ± 0.33	3.34 ± 1.05	2.88 ± 0.89	$0.46 \pm 0.36^*$

¹Difference between Pre and Post measurement

²Differences of *Jangguncha* beverage group and control group are significantly different at $p < 0.05$.

³Homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR)

= Insulin (μ U/mL) X glucose (mmol/L)/22.5

(3) 지질 대사 개선 효과

將軍茶음료군에 있어서 음료 섭취 전의 공복 혈청 콜레스테롤 농도는 203.3 ± 46.9 mg/dL이었으며, 12주 동안 將軍茶음료 제품을 섭취한 후 유의적으로 감소(9.3 ± 7.8 mg/dL)하여 194.0 ± 44.6 mg/dL로 나타났다($p < 0.05$, Table 17). 將軍茶군에 있어서 將軍茶음료 섭취 전의 혈청 중성지방 농도는 192.9 ± 122.7 mg/dL이었으며, 12주 동안의 실험기간 후 188.1 ± 10.4 mg/dL로 나타나, 시험기간 전, 후에 유의적인 차이가 없었다. 대조군의 경우 실험 전, 후의 중성지방, 총콜레스테롤 농도 사이에 유의적인 차이가 없었다. 將軍茶군과

대조군 모두 HDL-콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 농도는 시험기간 전, 후에 유의적인 차이가 없었다. 콜레스테롤의 비정상적인 증가는 관상동맥 질환의 위험요인이 되므로, 將軍茶 음료 섭취로 인한 콜레스테롤의 감소는 당뇨 합병증의 예방 및 개선에 기여할 것으로 기대된다.

Table 17. Serum lipid profile of control and *Jangguncha* beverage groups

	Control group			<i>Jangguncha</i> beverage group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference ¹
Triglyceride (mg/dL)	207.1±134.8	199.8±135.4	7.3±25.3	192.9±122.7	188.1±10.4	4.8±32.7
Total cholesterol (mg/dL)	207.9±28.2	207.5±28.6	0.4±9.9	203.3±46.9	194.0±44.6	9.3±7.8 ²
HDL-cholesterol (mg/dL)	41.4±4.5	42.9±5.4	-0.2±4.1	45.3±13.2	45.1±11.3	-0.7±3.7
LDL-cholesterol (mg/dL)	121.1±24.8	118.9±26.5	2.2±15.6	115.5±33.6	109.9±27.5	5.6±14.9

¹Difference between Pre and Post measurement

²Differences of *Jangguncha* beverage group and control group are significantly different at p<0.05.

(4) 간기능 개선효과

將軍茶음료의 섭취는 간기능 지표인 혈청 GOT, GPT 및 GGT 활성화에 유의적인 변화를 주지 않았다. 따라서 將軍茶음료의 섭취는 간기능에 유의성 있는 영향을 주지 않는 것으로 사료된다(Table 18).

Table 18. GOT, GPT and GGT activities of control and *Jangguncha* beverage groups

	Control group			<i>Jangguncha</i> beverage group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference ¹
GOT (U/L)	30.9±9.1	34.0±9.1	-3.1±10.3	30.4±13.4	32.4±15.0	-2.0±19.5
GPT (U/L)	28.5±13.2	28.1±7.0	0.4±11.8	25.0±13.1	25.7±14.1	-0.7±7.8
GGT (U/L)	33.7±21.7	35.1±20.4	-1.4±5.4	35.2±20.5	38.1±18.7	-2.9±5.6

¹Difference between Pre and Post measurement

2. 장군차의 유효활성 성분 규명 및 항당뇨 제품 개발

가. 將軍茶의 폴리페놀류 성분 분석

(1) 將軍茶 폴리페놀류의 정량 분석방법 확립

將軍茶의 추출물에 포함된 폴리페놀류의 분석을 위하여 HPLC를 사용하였다. 이 때 tyrosol을 내부표준물질로 사용하였으며 각 피크는 해당 성분의 표준물질을 사용하여 정성 및 정량분석을 수행하였다 (Fig. 14). 이 때 사용한 표준물질은 (-)-epicatechin (EC), (-)-epicatechin-3-O-gallate (ECG), (-)-gallocatechin-3-O-gallate (GCG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epigallocatechin- 3-O-gallate (EGCG), (+)-catechin (C), (-)-gallo catechin (GC), gallic acid (GA) 그리고 caffeine (CAF)을 사용하였다.

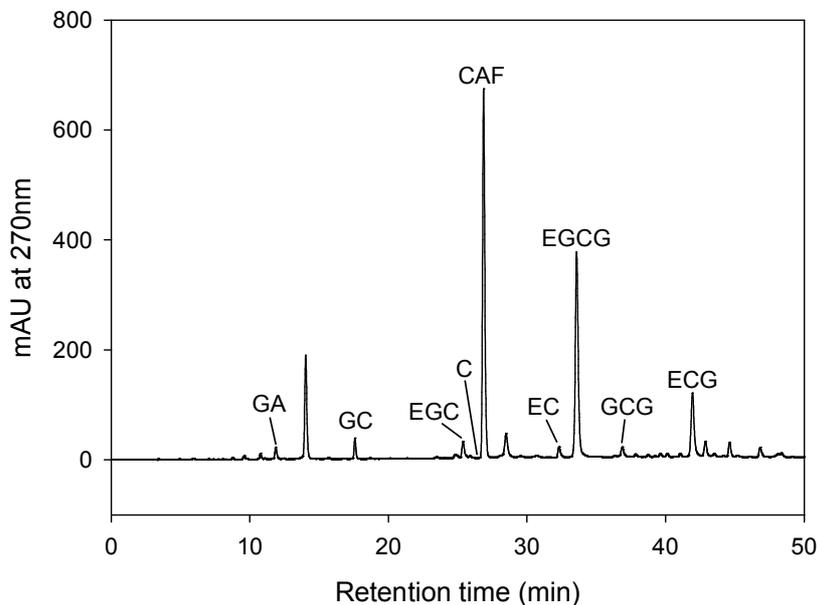


Fig. 14. HPLC analysis of polyphenolic compounds extracted from *Jangguncha*. GA, gallic acid; GC, (-)-gallocatechin; EGC, (-)-epigallocatechin; C, (+)-catechin; CAF, caffeine; EC, (-)-epicatechin; EGCG, (-)-epigallocatechin-3-O-gallate; GCG, (-)-gallocatechin- 3-O-gallate; and ECG, (-)-epicatechin-3-O-gallate.

(2) 將軍茶의 추출조건 결정

(가) 추출온도의 영향

將軍茶 세작 분말 0.45g에 증류수 30mL을 첨가한 후 60, 70, 80, 90°C에서 각각 30분 동안 추출한 후 폴리페놀류의 정량 분석을 실시한 결과, 온도가 증가함에 따라 용출되는 catechin 함량이 높은 것으로 나타났으며 80°C에서 가장 높은 EGCG 함량을 보였다. 따라서 이후 將軍茶 폴리페놀의 추출은 80°C에서 수행하였다 (Fig. 15).

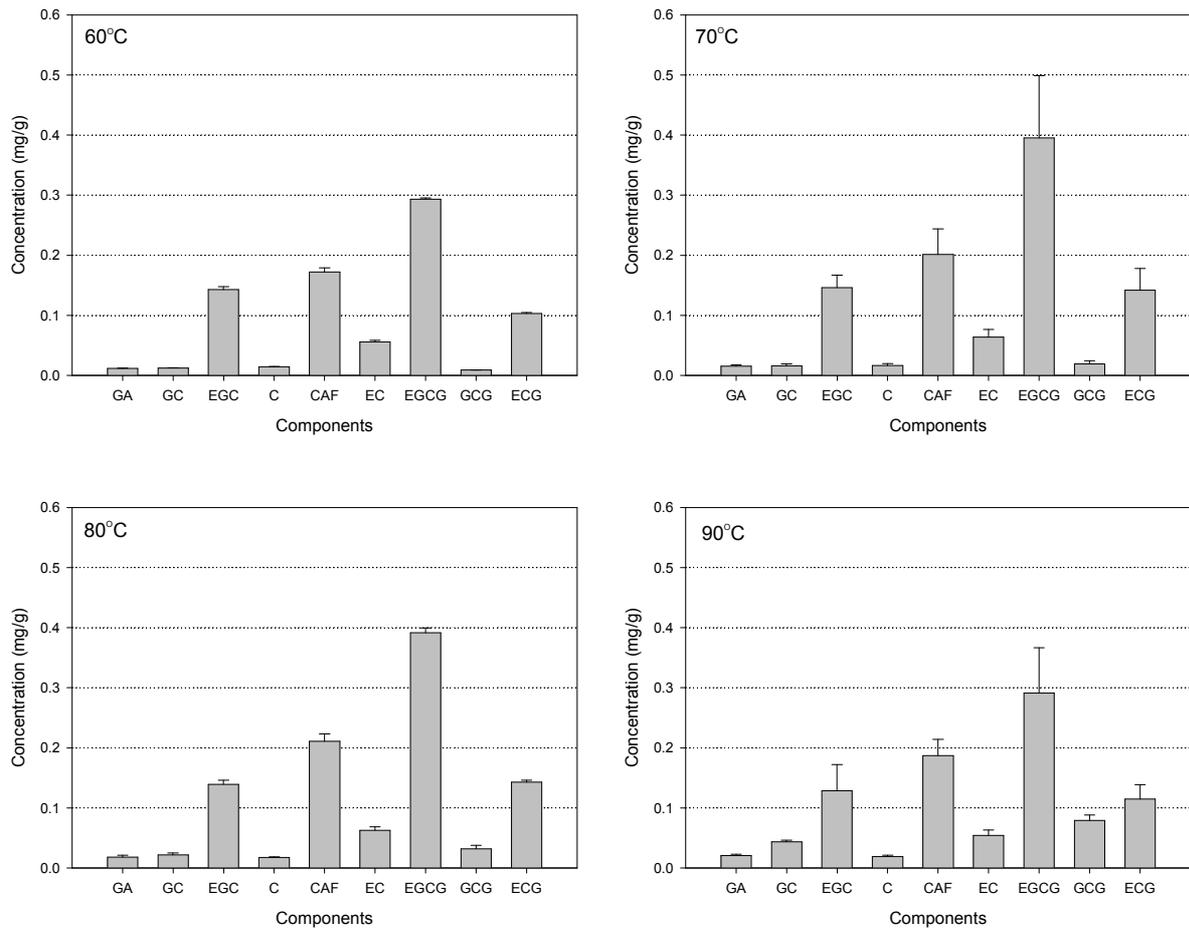


Fig. 15. Effect of extraction temperature on the extraction yield of polyphenolic compounds from *Jangguncha*.

(나) 추출시간의 영향

將軍茶 세작 분말 0.45g에 증류수 30mL을 첨가한 후 80°C에서 5, 10, 15, 20, 30분 동안 추출한 후 폴리페놀류의 정량 분석을 실시한 결과, 15분까지 시간이 증가함에 따라 용출되는 catechin 함량이 증가하였으나 이 후부터는 다시 감소하는 것으로 나타났으며 따라서 이후 將軍茶 폴리페놀의 추출은 80°C에서 15분간 수행하였다 (Fig. 16).

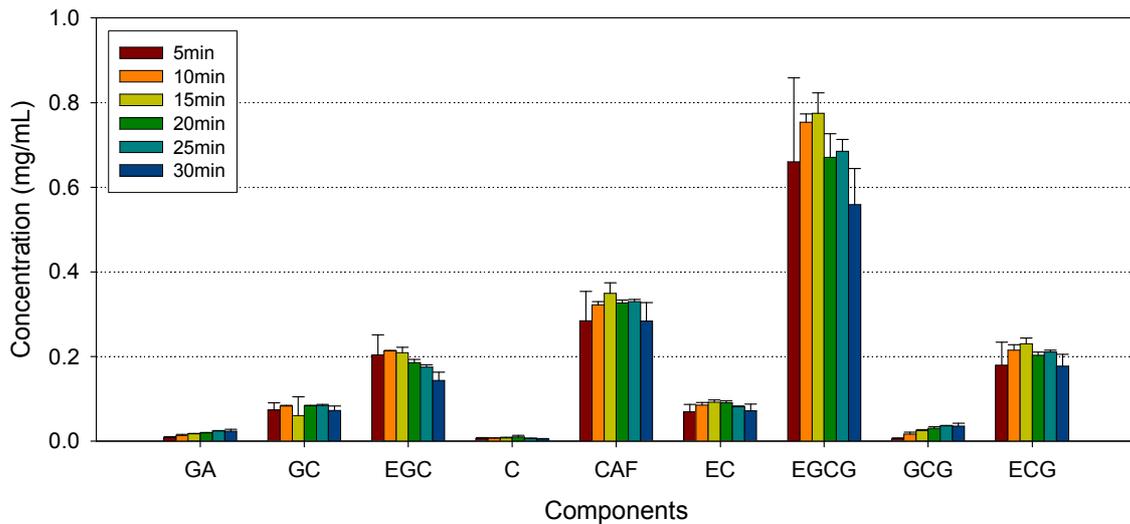


Fig. 16. Effect of extraction time on the extraction yield of polyphenolic compounds from *Jangguncha*.

(3) 將軍茶 제품별 및 생잎의 폴리페놀류의 성분 분석

將軍茶 제품들과 생잎에 포함되어 있는 폴리페놀류의 함량을 정량 분석하여 비교하였다. 이 때 각 시료는 분말 1.5g에 100mL의 증류수를 넣고 100°C에서 15분간 추출한 후 여과하여 사용하였다. 분석 결과 생잎, 우전, 세작, 중작, 대작 중 우전에서 가장 함량이 높았으며 수확시기가 늦어질수록 catechin 함량이 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 17). 또한 생잎의 경우도 catechin 함량이 우전과 유사하였다. 將軍茶의 catechin이 모두 추출되었다는 가정 하에 將軍茶의 함량을 제품 건조무게 g 당 mg으로 환산하면 우전의 경우 총 catechin 함량이 124.1 mg/g으로 나타났으며 그 중에서 EGCG가 61.01 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었다 (Table 19). 우전 다음으로는 세작 (109.9 mg/g), 대작 (104.6 mg/g), 중작 (100.0 mg/g)의 순서로 총 catechin 함량이 감소하였으며 황차의 경우는 총 catechin 함량이 27.5 mg/g으로 가장 적은 값을 나타내었다. 그 이유는 발효차인 황차가 가공 시 발효과정을 거치면서 많은 양의 catechin이 효소의 작용으로 다른 성분으로 전환되었기 때문인 것으로 판단된다. 생잎의 경우 가장 높은 값인 137.4 mg/g의 총 catechin 함량을 나타내었지만 잎의 크기별 시기별로 그 편차가 심한 것으로 나타났다.

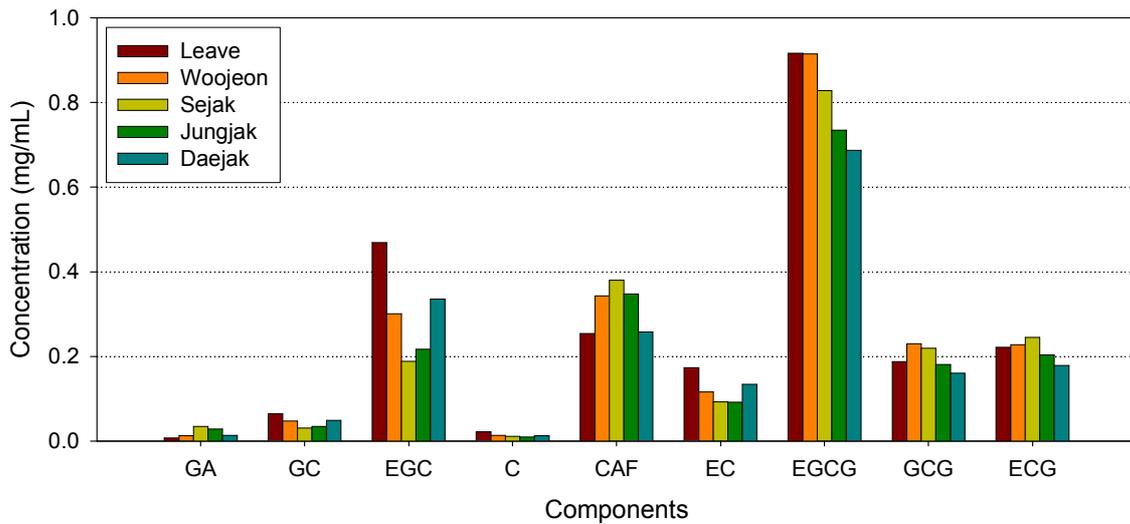


Fig. 17. Analysis of polyphenolic compounds extracted from various *Jangguncha* products.

Table 19. Contents of polyphenolic compounds from various *Jangguncha* products.

Products	GA	GC	EGC	C	CAF	EC	EGCG	GCG	ECG	Total (mg/g)	Total catechins ^a (mg/g)
Law leaves	0.5	4.3	31.3	1.4	16.9	11.6	61.1	12.5	14.8	154.4	137.4
Woojeon	0.8	3.1	20.0	0.9	22.9	7.7	61.0	15.3	15.2	147.0	124.1
Saejack	2.3	2.1	12.6	0.7	25.3	6.2	55.2	14.6	16.3	135.3	109.9
Jungjak	1.9	2.3	14.5	0.6	23.2	6.1	49.0	12.1	13.5	123.2	100.0
Daejak	0.9	3.2	22.3	0.8	17.2	8.9	45.8	10.7	11.9	121.8	104.6
Hwangcha	2.2	3.3	3.0	2.2	17.9	3.6	5.6	4.3	3.5	45.4	27.5

^aSum of the contents of polyphenolic compounds except caffeine (CAF).

(4) 將軍茶 생잎의 크기 및 시기별 폴리페놀류 분석

(가) 시료준비

수확시기에 따른 將軍茶 생잎의 catechin 함량을 비교 분석하고자 2007년 4월부터 2007년 12월까지 매달 동일한 장소에서 將軍茶 생잎을 수확하여 이를 크기에 따라 S-1, S-2, S-3, L-1, L-2로 분류하였다 (Fig. 18). S series는 연두색의 올해 돌아난 잎 중에서 채취하였으며 L series는 진한 녹색의 연령이 오래된 잎으로 채취하였다. 수확한 생잎은 동결 건조 후 분말화하여 사용하였다. HPLC 분석시료는 각 분말 1.5g에 100mL에 메탄올을 넣고 실온에서 12시간동안 추출한 후 여과하여 사용하였다.

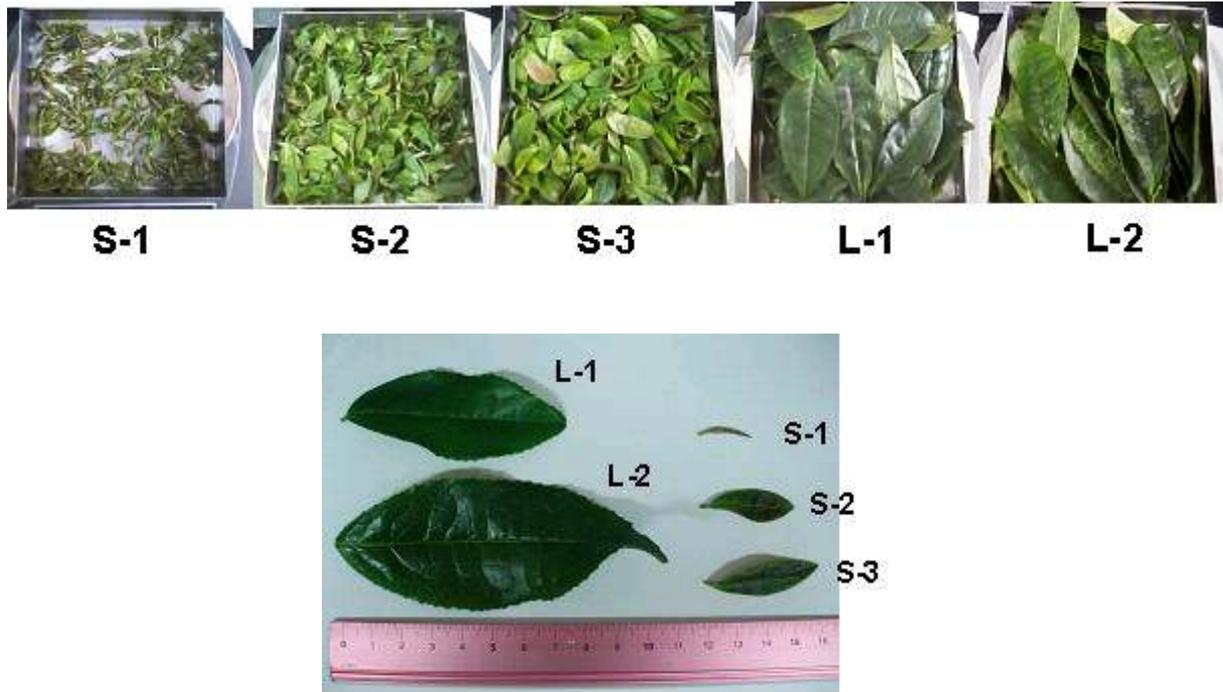


Fig. 18. Photographs of various size of *Jangguncha* leaf harvested on April.

(나) 수확시기별 將軍茶 catechin 함량 분석

매달 채취한 將軍茶 생잎의 수확시기별 catechin 함량을 분석한 결과 4월보다는 5, 6월로 갈수록 catechin의 함량이 전반적으로 높아지는 경향을 나타내었으며 9월까지 비교적 일정하게 유지되다가 10월부터 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 19, Table 20). 사계절 중 기온이 높은 여름에 catechin양이 높은 편이었으며 반대로 기온이 낮을수록 그 양이 감소하는 경향을 나타내었다. 다만 EGCG의 경우 7월에 갑자기 감소하였는데 수확 전에 실시한 將軍茶나무의 가지치기에 따른 영향으로 보인다. 잎 크기에 따른 catechin 함량을 살펴보면 크기가 커질수록 함량이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며 특히 L-1, L-2의 경우는 그 양이 상당히 적었다. 따라서, 기온이 높고 잎이 어릴수록 catechin의 함량이 높은 것으로 확인되었다. 카페인 함량의 경향은 catechin과 유사하게 나타났다.

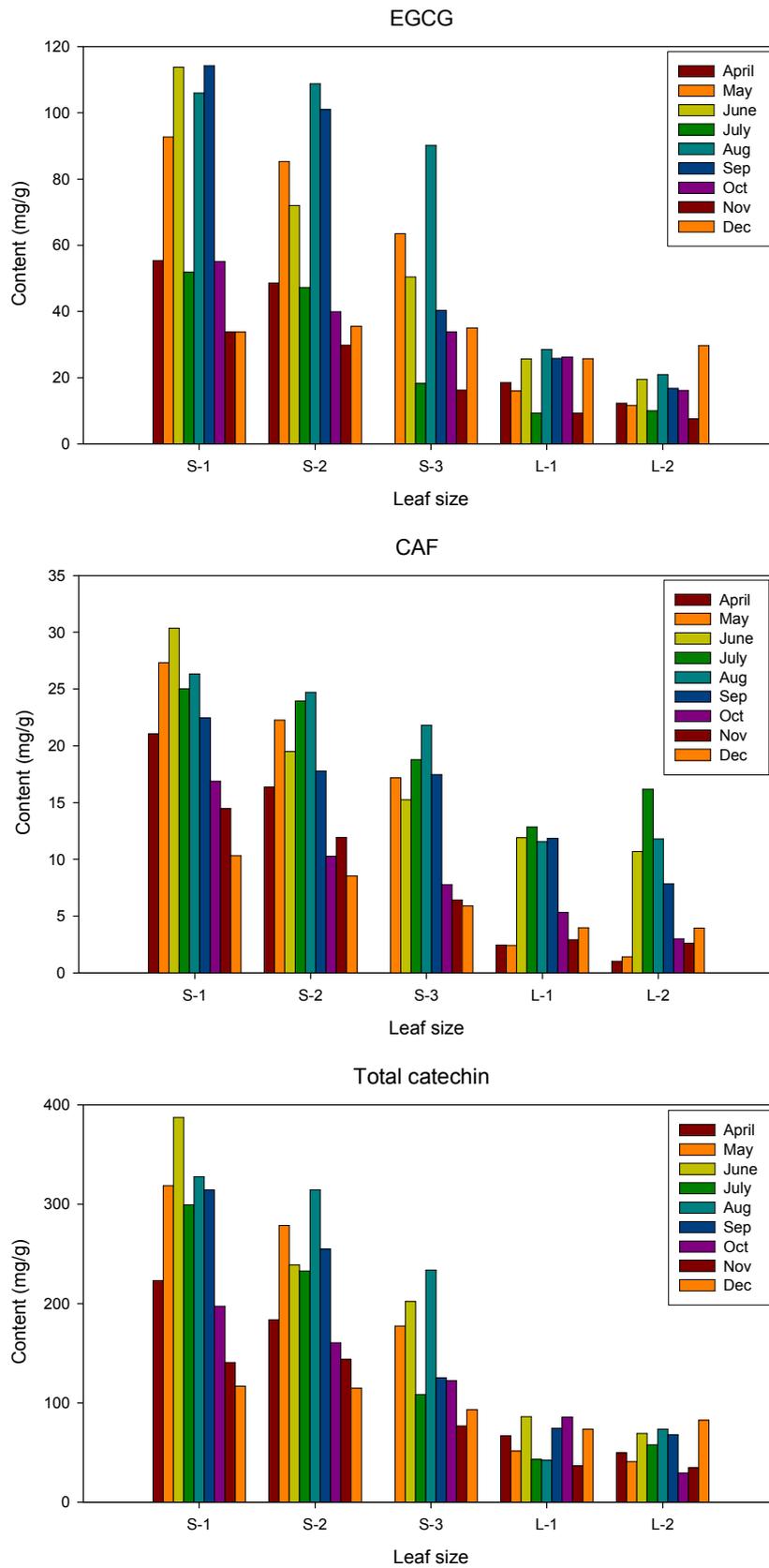


Fig. 19. Catechin contents of *Jangguncha* leaf according to harvest time.

Table 20. Catechin contents of *Jangguncha* leaf harvested on June

	Contents (mg/g leaf)				
	S-1	S-2	S-3	L-1	L-2
GA	3.6	0.6	0.2	0.1	0.1
GC	3.1	1.4	1.1	1.1	0.7
EGC	2.8	6.3	6.9	5.4	5.0
C	0.6	0.0	0.7	0.3	0.4
EC	12.1	16.9	23.8	13.5	10.7
EGCG	113.7	72.0	50.4	25.7	19.5
GCG	4.6	1.5	1.7	0.9	0.8
ECG	246.6	140.1	117.2	39.0	32.2
Total	387.1	238.7	202.2	86.0	69.4

(5) 산지별 녹차와 將軍茶의 폴리페놀류 분석

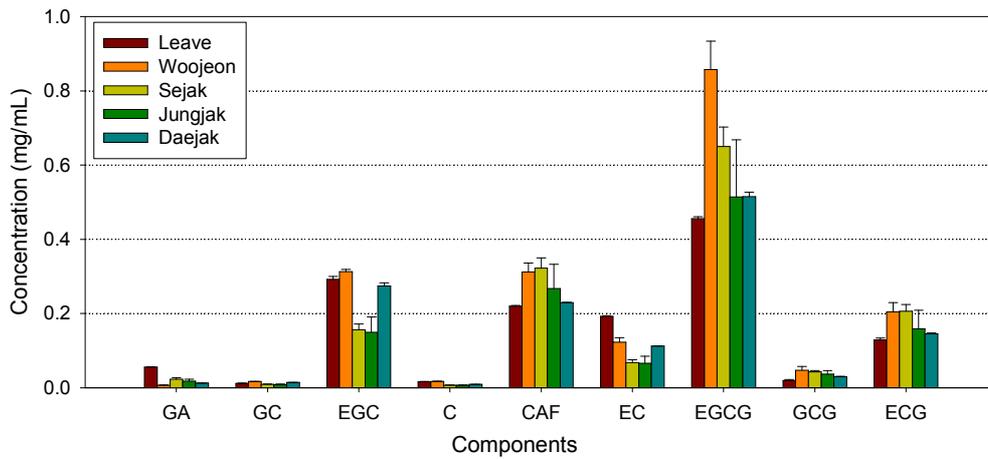
산지별 녹차(하동녹차, 보성녹차)와 將軍茶의 폴리페놀류의 함량을 분석하여 비교하여 보았다. 시료는 80°C에서 30분간 추출하여 사용하였으며 HPLC를 이용하여 폴리페놀류 성분 분석을 실시한 결과, 산지별로 함량에 따른 큰 차이는 없었으나 김해將軍茶와 보성녹차가 하동녹차에 비해 EGCG 및 전반적인 catechin 함량이 높은 것으로 나타났다 (Fig. 20). 특히 김해將軍茶의 경우 우전이 다른 제품에 비해 월등히 EGCG함량이 높았으며, 보성녹차의 경우는 시기에 따라 함량이 일정하게 변화하는 양상이 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

나. 將軍茶의 유효활성성분의 정제 및 생리 활성

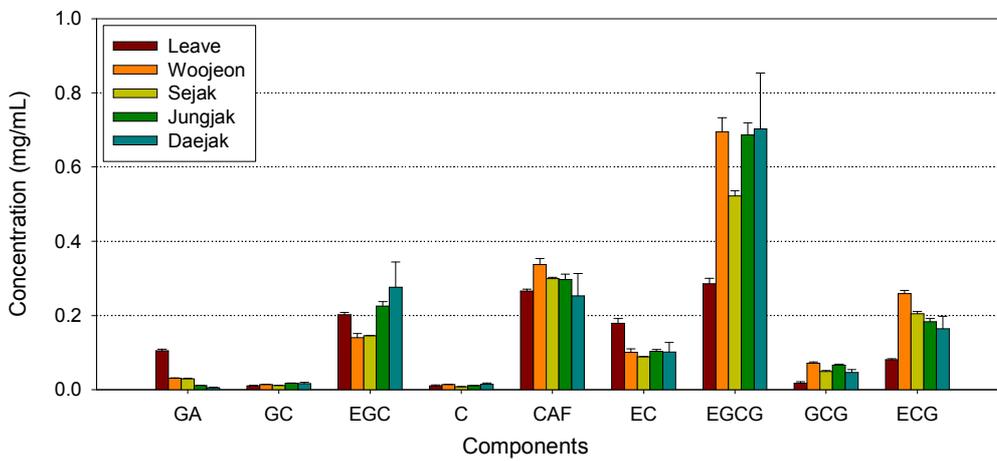
(1) 將軍茶 용매추출 및 계통분획

將軍茶의 생리활성 물질을 분리하기 위하여 將軍茶 세작 300g을 메탄올로 추출한 후 여러 가지 용매를 사용하여 계통분획 하였다. 메탄올 추출물은 25.2%의 수율로 얻을 수 있었으며 계통분획 후 메탄올 추출물에 대한 각 분획의 수율은 n-hexane 분획 42.4%, chloroform 분획 21.9%, ethylacetate 분획 13.1%, n-butanol 분획 8.0%, aqueous 분획 5.0%으로 n-hexane 분획에서 가장 높은 수율을 나타내었다 (Table 21).

(a) *Jangguncha* (Gimhae)



(b) Green tea (Hadong)



(c) Green tea (Bosung)

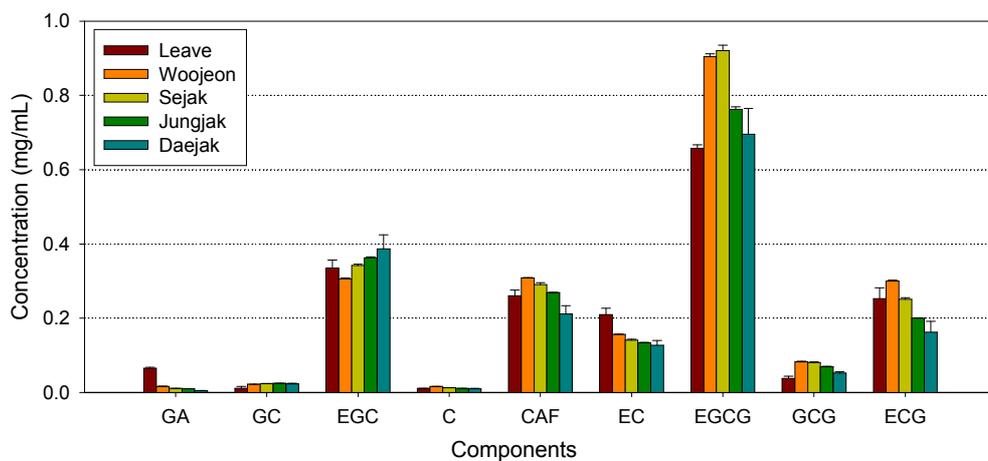


Fig. 20. Comparison of the contents of polyphenolic compounds among *Jangguncha* from Gimhae, green tea from Hadong and Bosung.

Table 21. Yields of solvent extracts from *Jangguncha* Seajack.

Fractions	Yield (%)
Methanol	25.2
n-Hexane	42.4
Chloroform	21.9
Ethylacetate	13.1
n-Butanol	8.0
Aqueous	5.0

(2) 將軍茶 용매분획의 생리활성 측정

(가) 將軍茶의 항산화 활성

將軍茶(세작) 추출물의 항산화 활성을 측정하기 위하여 DPPH radical scavenging activity와 Trolox equivalent antioxidant capacity(TEAC) 방법을 이용하였다. DPPH 방법으로 IC₅₀ 값을 측정한 결과, 메탄올 추출물은 8.51 μ g/mL을 나타내었으며 용매분획의 경우 ethylacetate 추출물이 3.96 μ g/mL로 가장 우수한 항산화활성을 나타내었으며 아스코르브산(3.73 μ g/mL)과 유사하였다(Fig. 21a). 다른 용매분획도 수용액층을 제외한 모든 분획층에서 비교적 높은 라디칼소거능을 나타내었다. TEAC방법으로 항산화활성을 측정한 결과, 메탄올 추출물은 0.57mM Trolox equivalent를 나타내었으며 용매분획의 경우 ethylacetate 추출물이 1.59mM Trolox equivalent로 가장 우수한 항산화활성을 나타내었다 (Fig. 2-8b). 將軍茶 추출물의 항산화활성은 추출물에 포함된 폴리페놀류의 항산화활성에서 기인하는 것으로 사료된다.

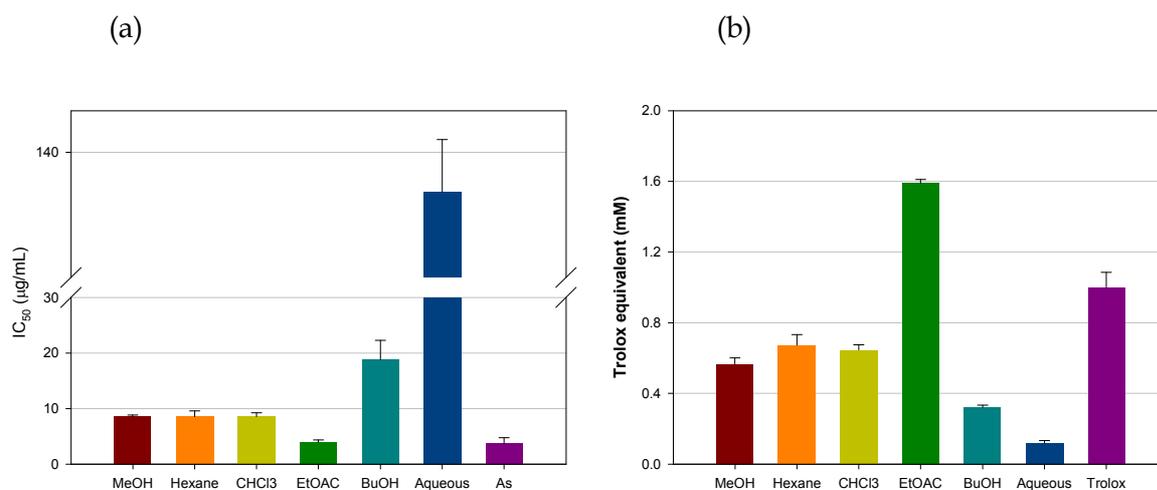


Fig. 21. Antioxidant activity of *Jangguncha* solvent extract. (a) DPPH radical scavenging activity; (b) Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

(나) 將軍茶의 α -glucosidase 저해활성

계통분획한 將軍茶 추출물의 α -glucosidase에 대한 저해 활성을 측정하였다 (Fig. 22). α -Glucosidase에 대한 저해 활성이 높을 경우 체내에 존재하는 α -glucosidase의 활성을 억제하여 전분을 섭취하였을 때 血糖량의 급격한 상승을 억제하는 항당뇨 효과를 기대할 수 있다. 효모에서 유래한 α -glucosidase에 대하여 *p*-nitrophenyl glucoside를 기질로 효소활성을 50% 저해하는 농도를 측정한 결과, 메탄올 추출물이 8.79 μ g/mL의 강한 저해 활성을 나타내었다. 용매분획의 경우 ethylacetate 분획이 5.27 μ g/mL로 대조군인 Acarbose(2.36mg/mL)와 비교해 볼 때 매우 우수한 항당뇨 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 항산화 활성과 마찬가지로 α -glucosidase 저해활성이 catechin류에서 기인하는 것으로 추정되어 EGCG에 대한 IC₅₀값을 측정한 결과 5.26 μ g/mL로 ethylacetate 분획의 저해 활성과 비슷하게 나타나 α -glucosidase 저해활성은 EGCG와 같은 catechin류와 연관이 큰 것으로 사료된다.

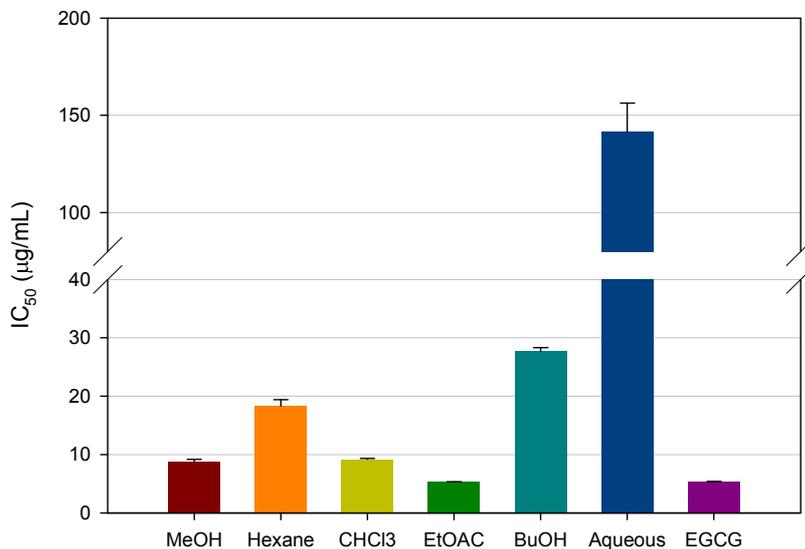


Fig. 22. α -Glucosidase inhibitory activity of *Jangguncha* solvent extracts.

(다) 將軍茶의 tyrosinase 저해활성

將軍茶 추출물의 미백효과를 알아보기 위해 tyrosinase 저해 활성을 측정하였다 (Fig. 2-10). 메탄올 추출물은 76.5 μ g/mL의 농도에서 효소의 활성을 50% 감소시켰으며 용매분획의 경우 ethylacetate 추출물이 39.5 μ g/mL의 IC₅₀값으로 가장 우수한 저해 활성을 나타내었다. 그러나, tyrosinase 저해제로 잘 알려진 hydroquinone(5.5 μ g/mL)과 비교해볼 때 將軍茶 추출물의 tyrosinase 저해 활성은 비교적 약하게 나타났다.

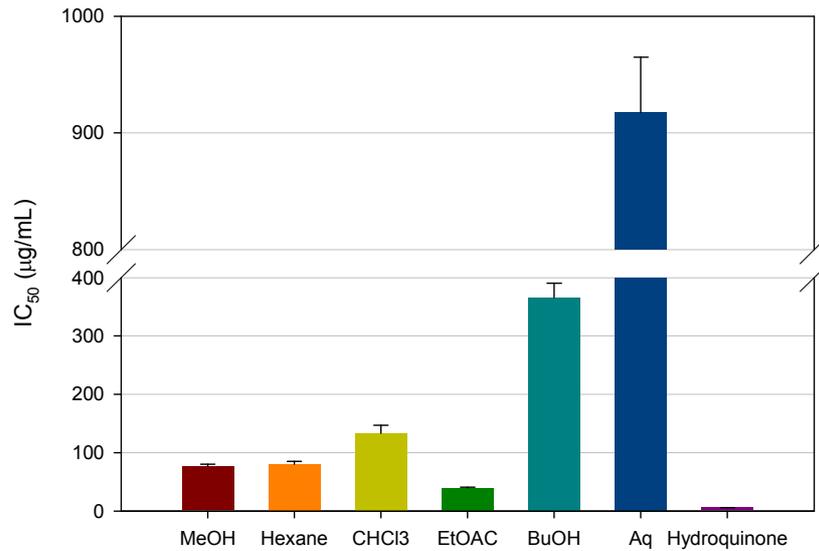


Fig. 23. Tyrosinase inhibitory activity of *Jangguncha* solvent extracts.

(라) 將軍茶의 total polyphenol 및 total flavonoid 함량

將軍茶 세작으로부터 계통분획한 각 추출물의 total polyphenol 함량을 측정하였다 (Table 22). 메탄올 추출물은 18.7%의 함량을 보였으며 이로부터 계통분획한 추출물 중 ethylacetate 추출물이 25.3%로 가장 높은 함량으로 보였으며 hexane 17.3%, chloroform 15.4% 순으로 나타났다. Total flavonoid 함량은 메탄올 추출물의 경우 2.2%였으며 ethylacetate 추출물이 3.6%로 가장 높았으며 hexane 2.2%, chloroform 1.8%의 순으로 나타났다. 이 결과로부터 將軍茶 추출물은 flavonoid계 물질보다 polyphenol계 물질이 풍부한 것을 알 수 있었으며, 특히 ethylacetate 추출물에서 함량이 가장 많은 것으로 나타났다으며 이는 將軍茶의 catechin 성분에 기인한 것으로 사료된다.

Table 22. Total polyphenol and total flavonoid content of solvent extracts of *Jangguncha*.

Extracts	Total polyphenol (%)	Total flavonoid (%)
Methanol	18.7	2.2
n-Hexane	17.3	2.2
Chloroform	15.4	1.8
Ethylacetate	25.3	3.6
n-Butanol	9.2	0.9
Aqueous	1.6	0.1

(3) 將軍茶 활성분획의 주요 성분 분석

(가) 유효활성 분획의 HPLC 분석

항산화활성 및 α -glucosidase 저해활성이 우수한 ethylacetate 분획의 폴리페놀류 성분을 HPLC를 이용하여 분석하였다 (Fig. 24). 그 결과 ethylacetate 분획의 폴리페놀류 성분의 분포가 메탄올 추출물과 유사한 것으로 확인되었으며 따라서 대부분의 폴리페놀류 성분이 ethylacetate 분획에 존재하는 것으로 판단되었다.

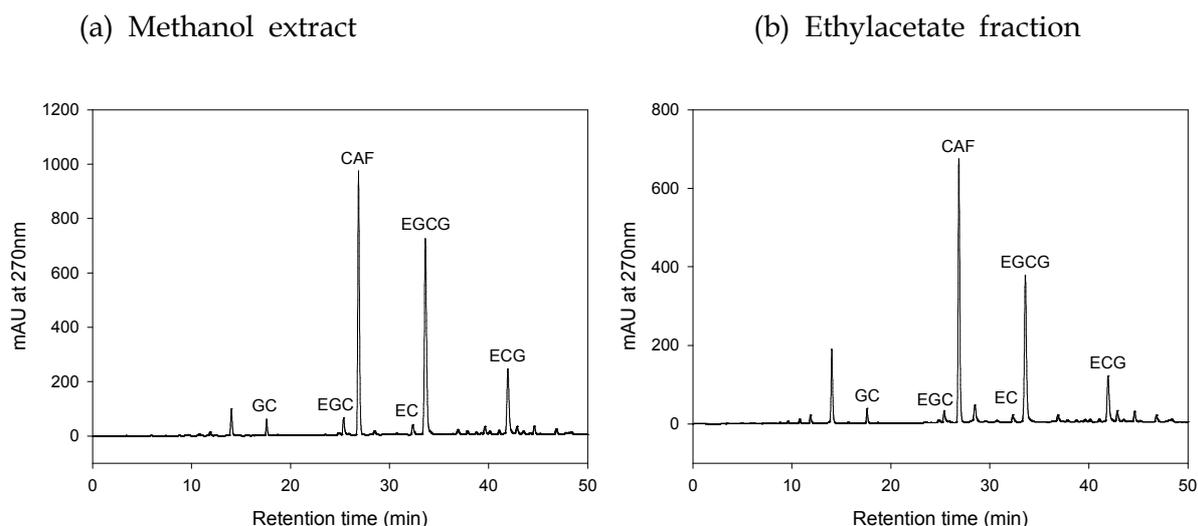
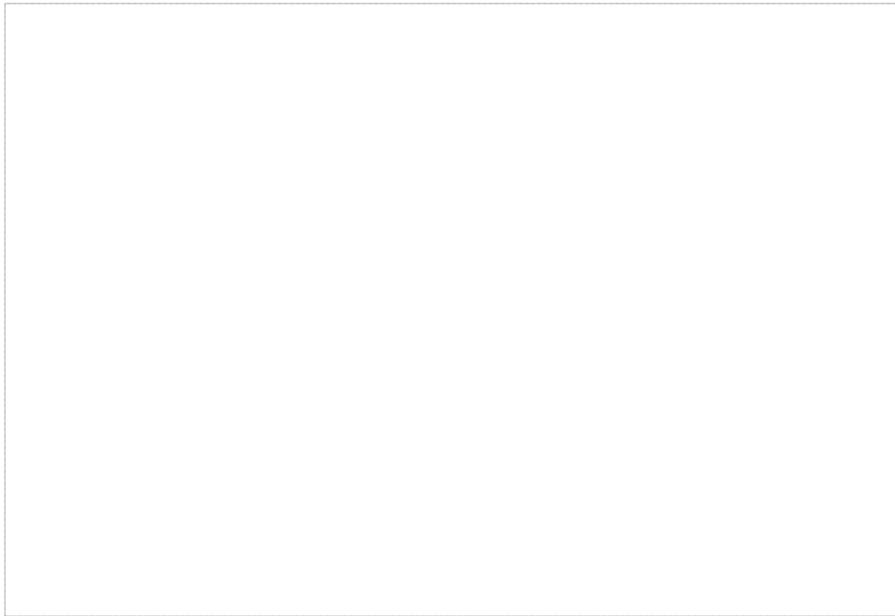


Fig. 24. HPLC analyses of methanol extract and ethylacetate fraction from *Jangguncha*.

(나) EGCG의 α -glucosidase 저해메커니즘

EGCG의 α -glucosidase에 대한 저해 활성이 우수한 것으로 나타나 저해메커니즘을 밝히기 위해 inhibition kinetics를 수행하였다 (Fig. 25). 여러 가지 농도의 기질과 EGCG에 따른 효소활성을 측정한 후 Lineweaver-Burk plot과 Dixon plot을 분석한 결과 α -glucosidase에 대한 EGCG의 저해는 경쟁적 저해를 나타내었으며 저해상수(K_i)는 4.94nM로 나타나 저해활성이 대단히 우수한 것으로 나타났다. EGCG는 將軍茶 추출물 중에서 가장 많이 포함되어 있는 catechin의 일종으로 將軍茶의 α -glucosidase 저해에 의한 항당뇨효능은 EGCG와 같은 catechin류에 의한 것으로 판단된다.

(a) Lineweaver-Burk plot



(b) Dixon plot

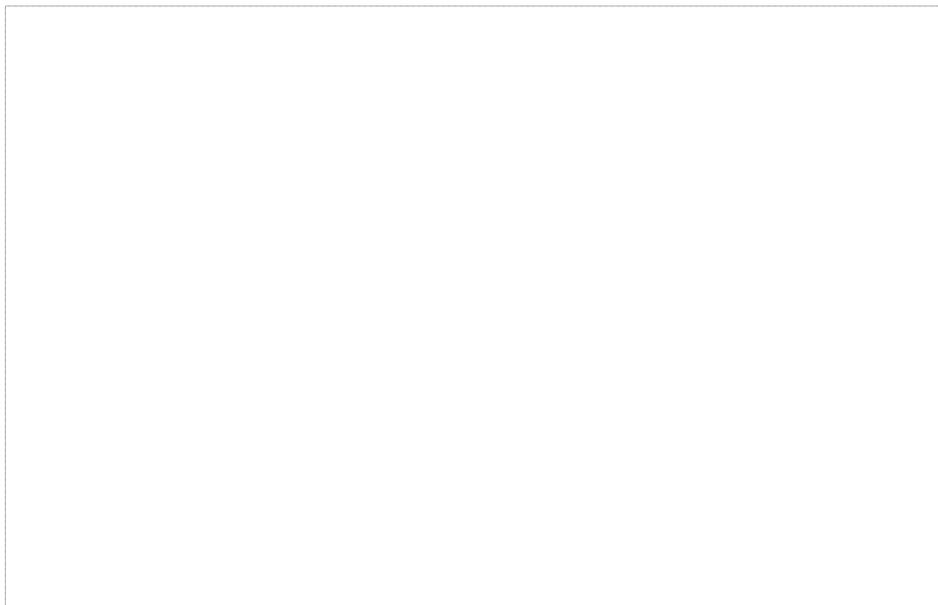


Fig. 25. Inhibition kinetics of α -glucosidase against EGCG.

다. 將軍茶의 활성성분이 포함된 음료의 개발

將軍茶를 이용한 녹차 음료의 개발을 위하여 將軍茶 추출조건, 가열 살균시 catechin 함량 감소 정도, ascorbic acid의 첨가에 의한 catechin 보호 효과 등에 대한 예비 실험을 실시하였다. 추출시료는 경제적인 측면을 고려하여 중작을 이용하였다.

(1) 將軍茶 유효활성성분의 안정성 평가

(가) 將軍茶의 추출조건 확립

將軍茶의 풍미가 가장 우수한 추출조건을 확립하기 위하여 온도별(60 or 70°C), 추출시간별(5 or 10min), 중작 첨가량별(2g or 4g/100mL)로 추출한 將軍茶의 관능적 특성 및 catechin 함량을 측정하였다. 예비 실험 결과 70°C 이상의 높은 온도에서 추출할 경우 쓴맛이 강하여 음료로 부적합하였으며 온도는 60°C, 70°C, 중작 첨가량은 2g, 4g에서 가장 우수한 관능적 특성을 나타내었다. 따라서 중작 2g 혹은 4g을 5분 및 10분 동안 각각 60°C, 70°C 물로 추출한 후 냉장보관 후의 catechin 함량 및 관능적 특성을 살펴보았다 (Table 23). 이 때 일반적인 녹차음료는 냉장 보관 후 음용하게 되므로 將軍茶 추출액을 냉장보관 한 후 평가를 실시하였다. 그 결과 추출직후에 좋은 맛을 냈던 10분 추출물은 catechin 함량이 높고 향과 맛이 비교적 강하였지만 냉장 후 특히 쓴맛이 강하게 느껴져 음용하기에 부적합 것으로 판단되었다. 따라서 중작 2g을 60°C 혹은 70°C 물 100mL에 5분 동안 추출할 때 냉장 후 맛, 색, 향에서 가장 뛰어난 것을 확인하였다.

Table 23. Catechin contents of *Jangguncha Jungjak* tea at various conditions

Catechin (mg/100mL)	2g <i>Jungjak</i> in 100mL water				4g <i>Jungjak</i> in 100mL water			
	60°C		70°C		60°C		70°C	
	5min	10min	5min	10min	5min	10min	5min	10min
GA ¹⁾	3.6	3.0	3.6	4.8	4.8	8.4	6.0	7.6
GC	7.2	6.2	9.0	14.4	10.4	20.8	14.8	20.0
EGC	1.4	1.6	3.2	6.6	4.0	9.2	6.4	18.0
C	0.6	1.6	0.0	0.8	1.2	2.4	0.8	5.6
EC	7.8	9.6	6.6	16.0	10.0	16.0	13.6	38.0
EGCG	12.8	14.8	29.4	54.4	30.8	81.2	53.6	148.0
GCG	1.6	1.0	0.8	3.2	0.8	1.6	0.0	0.4
ECG	39.2	37.6	43.0	77.6	52.0	109.6	73.6	207.2
Total	74.2	75.8	95.6	177.8	113.6	248.4	168.8	445.6
CAF	17.4	15.6	20.4	29.0	22.4	45.2	32.8	67.6

¹⁾GA, gallic acid; GC, (-)-gallocatechin; EGC, (-)-epigallocatechin; C, (+)-catechin; EC, (-)-epicatechin; EGCG, (-)-epigallocatechin-3-O-gallate; GCG, (-)-gallocatechin-3-O-gallate; ECG, (-)-epicatechin-3-O-gallate; and CAF, caffeine.

(나) 將軍茶음료의 가열 살균에 따른 영향 및 ascorbic acid의 catechin 보호효과

將軍茶 중작 추출음료의 저장성을 높이기 위하여 가열 살균을 할 경우 관능적 특성 및 catechin의 함량 변화를 측정하였으며 ascorbic acid를 첨가하여 가열살균 시 catechin의 보호효과를 실험하였다. 가열 처리는 將軍茶 중작 추출물(2g/100mL, 60°C, 5min)을 100°C에서 30분 동안 처리하였다. 가열 처리 후 음료의 관능적 차이는 크지 않았으나 좀 더 구수한 맛과 향기가 더해져 음용하기 좋았다. 그러나 가열 처리 후 catechin의 함량은 크게 감소하여 대조군과 비교하여 32.5%의 catechin이 손실된 것으로 확인되었다 (Table 24). 특히 將軍茶의 주요 생리활성성분인 EGCG의 손실이 두드러져 열처리 후 64.2%가 파괴되었다. 열처리에 의한 catechin의 손실을 막기 위하여 항산화물질인 ascorbic acid를 농도별로 첨가하여 catechin의 보호효과를 측정하였다 (Table 24). Ascorbic acid의 농도가 증가할수록 catechin의 손실이 감소하였으며 1.0mg/mL 이상의 농도에서 catechin의 파괴가 거의 이루어지지 않았음을 확인하였다. Ascorbic acid의 첨가에 의한 pH의 변화를 측정한 결과 첨가량이 증가할수록 pH가 감소하여 ascorbic acid를 첨가하지 않는 將軍茶음료의 pH는 7.17로 중성이었으나 ascorbic acid의 농도가 1.0mg/mL 때 5.01까지 감소하였으며 가열처리 전후의 변화는 거의 없었다 (Table 25). Ascorbic acid를 1.0mg/mL보다 많이 첨가할 경우 음료에서 신맛이 강하게 나타났기 때문에 최적첨가량은 1.0mg/mL로 결정하였으며 이 때 將軍茶음료의 맛, 색, 향이 가장 우수하였다.

Table 24. Catechin contents of *Jangguncha Jungjak* tea with ascorbic acid after heat treatment for 30min at 100°C

Catechin (mg/100mL)	Control	Ascorbic acid addition (mg/mL)			
		0.0	0.5	1.0	2.5
GA ¹⁾	3.8	2.8	3.6	4.0	3.8
GC	7.6	6.6	7.4	8.2	10.2
EGC	4.6	2.0	4.2	4.8	4.8
C	0.0	0.0	0.0	0.4	0.6
EC	8.0	4.0	5.2	9.4	5.4
EGCG	34.6	12.4	33.4	35.8	33.6
GCG	0.0	10.8	1.8	0.0	0.0
ECG	46.0	32.2	35.8	50.8	44.4
Total	104.6	70.6	91.8	113.0	102.6
CAF	17.6	17.8	17.8	19.6	17.8

¹⁾GA, gallic acid; GC, (-)-gallocatechin; EGC, (-)-epigallocatechin; C, (+)-catechin; EC, (-)-epicatechin; EGCG, (-)-epigallocatechin-3-O-gallate; GCG, (-)-gallocatechin-3-O-gallate; ECG, (-)-epicatechin-3-O-gallate; and CAF, caffeine.

Table 25. pH change of *Jangguncha Jungjak* tea according to addition of ascorbic acid and heat treatment for 30min at 100°C

Ascorbic acid concentration (mg/mL)	Heat treatment	
	before	after
0.0	7.17	7.06
0.5	5.66	5.91
1.0	5.01	5.19
2.5	4.42	4.42

(2) 將軍茶음료의 카페인 함량 감소를 위한 전처리 방법 평가

(가) 중작의 2차 추출

중작 2g을 물 100mL에 넣어 90°C에서 1, 2분간 1차 추출 후, 60, 70°C에서 5분간 2차 추출하여 HPLC성분 분석을 하였다 (Table 26).

Table 26. Effect of repeated extraction on the contents of total catechin and caffeine

mg/g	1st ext.	2nd ext.	
	90 °C	60 °C	70 °C
Total catechin (TC)	No treatment	19.38	37.93
	1 min	39.64	25.92
	2 min	22.05	29.05
Caffeine (CAF)	No treatment	5.61	9.74
	1 min	9.61	6.29
	2 min	5.62	7.24
TC : CAF	No treatment	3.45:1	3.89:1
	1 min	4.12:1	4.12:1
	2 min	3.92:1	4.01:1

중작을 90°C에서 1차 추출 후, 60°C와 70°C에서 추출 하였을 경우 두 온도 모두 catechin의 caffeine에 대한 비율이 1차 추출을 하지 않은 것에 비하여 다소 증가한 것으로 나타났다. 온도가 높을수록 추출이 잘되는 catechin류 및 caffeine이지만 90°C에서 1차 추출을 하는 동안 catechin류보다는 caffeine이 더 많이 추출 되었을 것이라 생각되며, 이로 인하여 2차 추출을 하였을 경우에 catechin의 비율이 증가되었을 것이라 사료된다.

(나) 將軍茶 생잎 열처리

將軍茶 생잎 2g을 끓는 물에서 1, 3, 5 분 동안 열처리한 후 methanol에 추출하여 HPLC로 catechin을 분석하였다 (Table 27).

Table 27. Effect of heat treatment of unprocessed leaf on the contents of total catechin and caffeine

Sample	Total catechin	Caffeine	(mg/g)
			T.C. : CAF
No heating	307.86	24.34	12.65 : 1
1min heating	528.02	26.20	20.15 : 1
3min heating	388.91	15.08	25.79 : 1
5min heating	344.08	16.79	20.49 : 1

將軍茶 생잎을 열처리 한 결과 열처리 시간이 길어질수록 추출 되는 total catechin의 양이 줄었는데 caffeine 또한 줄어드는 경향을 나타내었다. Total catechin과 caffeine의 비율을 비교해보면 control의 경우 12.65 : 1이었던 것에 비하면 3분 동안 열처리 하였을 경우 그 비율이 25.79 : 1로 가장 높았다. 이와 같은 결과를 바탕으로 將軍茶 생잎을 열처리한 후 제다공정을 거쳐 將軍茶를 제조할 경우 caffeine의 함량을 크게 낮출 수 있을 것이라 사료된다.

(다) 추출액 pH에 따른 catechin변화

카페인 함량을 낮추기 위하여 추출액의 pH를 조절하였다. 추출액의 pH는 10% Ascorbic acid 용액을 이용하여 조절한 후 70℃에서 2분간 추출하여 맛과 향을 비교하였고, HPLC를 이용하여 성분분석을 하였다 (Table 28).

Table 28. Effect of extraction pH on the contents of total catechin and caffeine

Sample	Total catechin	Caffeine	(mg/g)
			T.C. : CAF
Control	13.42	4.70	2.8 : 1
pH 6	17.38	4.70	3.7 : 1
pH 5	17.82	4.50	4.0 : 1
pH 4	22.00	4.96	4.4 : 1

추출액의 pH를 조절하여 증작을 추출 한 결과 total catechin과 caffeine의 양을 비교해보면, control의 경우 total catechin : caffeine= 2.8 : 1 보다 pH4로 추출 하였을 경우 4.4 : 1 로 비율이 높아졌다. 낮은 pH에서는 catechin류가 많이 추출 되고, caffeine이 적게 추출된다는 보고와 비교해 볼 때, pH가 낮아질수록 추출되는 catechin의 양이 많아지는 것을 확인 할 수 있었다. 반면 caffeine의 추출되는 양에는 큰 차이가 없었다. 맛을 비교하였을 때 pH 5이하에서는 catechin의 비율이 많아지는 하였으나 차에서 신맛이 나며 향이 좋지 않아 차 추출액으로 적용하기 어려웠다.

(라) 추출 시 효소 첨가

Caffeine 함량을 낮추기 위해 추출 시 Rapidase TF를 첨가하였다. 추출 후, 80°C에서 30분간 중탕하여 효소 반응을 정지시킨 후, HPLC를 이용하여 성분 분석을 하였다 (Table 29).

Table 29. Effect of Rapidase TF treatment on the contents of total catechin and caffeine

Sample	Total catechin	Caffeine	(mg/g)
			T.C. : CAF
Without enzyme	26.63	11.74	2.27 : 1
With enzyme	37.74	17.36	2.17 : 1

효소를 첨가하여 추출한 결과 효소를 첨가하여 추출 하였을 때 total catechin이 첨가전보다 41% 정도 더 많아 추출 되었다. 그리고 caffeine 또한 그 추출량이 47% 증가하여 효소 첨가 시 caffeine 역시 추출량이 늘어난다는 것을 알 수 있었다. 효소 첨가 후에 total catechin 및 caffeine 모두 추출량이 늘어나 둘의 비율에는 차이가 없었다.

(마) 이산화탄소 아임계추출

① 증작

증작을 이산화탄소 아임계 추출기를 이용하여 처리한 후 HPLC를 이용하여 성분 분석을 하였다 (Table 30).

Table 30. Effect of CO₂ extraction on the contents of total catechin and caffeine of *Jungjak*

Sample	Total Catchin	Caffeine	(mg/g)
			T.C. : CAF
Before CO ₂ extraction	16.24	4.17	3.89 : 1
After CO ₂ extraction	29.54	6.74	4.38 : 1

이산화탄소 아임계 추출기를 이용하여 추출 한 결과 추출기를 이용하기 전보다 이용 후 추출된 total catechin의 양이 약 81% 증가함을 알 수 있었다. 그리고 caffeine 또한 추출 되는 양이 증가하여 total catechin : caffeine의 비율을 비교해 보았을 때, 추출 전 3.89 : 1에서 추출 후 4.38 : 1로 비율이 증가하였으나 추출비용이 고가이고 장치의 추출용량이 제한되어 있어 산업적 적용은 곤란한 것으로 판단되었다.

② 분쇄한 증작

증작 분말을 이산화탄소 아임계 추출기를 이용하여 처리한 후 HPLC를 이용하여 성분 분석을 하였다 (Table 31).

Table 31. Effect of CO₂ extraction on the contents of total catechin and caffeine of Jungjak powder

Sample	Total catechin	caffeine	(mg/g)
			T.C. : CAF
Before CO ₂ extraction	15.61	4.20	3.72 : 1
After CO ₂ extraction	27.98	5.76	4.86 : 1

중작을 분쇄하여 이산화탄소 아임계 추출한 결과 분쇄하지 않고 추출한 결과와 비슷하였다. 아임계 추출전보다 추출 후에 total catechin이 79% 증가하였으며, caffeine도 더 많이 추출 되었으며 37% 증가함을 알 수 있었다. Total catechin : caffeine 의 비율을 살펴보았을 때 분쇄하지 않고 추출한 결과와 같이 추출 전 3.72 : 1에서 추출 후 4.86 : 1로 증가하여 중작 잎을 이용한 결과와 유사하였다.

(3) 將軍茶 유효활성성분의 추출조건 최적화

(가) 중작의 양

차잎의 양을 물 200mL당 1g, 2g, 3g 으로 하여 60°C에서 5분간 추출 하여 맛을 비교하였으며, HPLC를 이용하여 성분 분석을 하였다 (Table 32).

Table 32. Contents of total catechin and EGCG according to the amount of Jung-jak

Weight of Jung-jak	Total catechin	(mg/g)
		EGCG
1g	22.11	1.67
2g	24.32	6.97
3g	29.54	12.05

1g으로 추출 한 것은 맛이 미미했으며, 3g으로 추출했을 경우 total catechin 및 EGCG의 양이 가장 많음을 알 수 있었다. 하지만 그 맛은 향이 강하고, 쓴맛이 강하였으며 목 넘김이 좋지 않아 기호도가 낮았다. 그래서 catechin 및 EGCG의 양이 적지 않으며 맛과 향이 우수한 2g/200mL의 농도로 추출하기로 결정하였다.

(나) 2차 추출

2g/200mL으로 60°C에서 1차 추출과 2차 추출의 시간을 달리하여 추출한 후 HPLC를 이용하여 성분 분석을 하였다 (Table 33).

Table 33. Contents of total catechin and EGCG according to extraction time

		(mg/g)	
First extraction(min)	Second extraction(min)	Total catechin	EGCG
2	0	8.97	1.40
	2	6.52	0.46
	5	11.53	1.88
	10	21.03	3.65
5	0	21.92	3.91
	2	4.64	0.31
	5	11.43	0.57
	10	16.76	1.28
10	0	35.19	7.39
	2	2.15	0.19
	5	4.95	0.09
	10	9.42	0.15

2분 동안 1차 추출 후 다시 2분, 5분 동안 2차 추출을 한 결과, catechin의 함량도 높지 않았고 맛이 미미하여 추출 조건으로 적합하지 않다고 판단하였다. 반면 10분 동안 2차 추출 하였을 때에는 catechin의 양은 많았으나 쓴맛이 강하여 기호도가 낮아 적합하지 않다고 판단하였다. 1차 추출을 5분간 한 후, 다시 2차 추출을 하였을 때에, 각 조건마다 맛은 전체적으로 좋았으나 2분, 5분 동안 추출을 한 경우에는 catechin의 함량이 낮다고 판단되었다. 10분 동안 2차 추출을 하였을 때, 맛과 향이 좋았으며, catechin의 양도 많아 추출 조건으로 적절하다고 생각하였다. 마지막으로 10분 동안 1차 추출만 했을 경우 catechin 및 EGCG의 양이 가장 많았지만 쓴맛이 강하여 차로서는 적합하지 못하다고 판단하였다. 10분 동안 1차 추출 후 다시 10분 동안 2차 추출을 한 경우 차로서의 적절한 맛과 향을 지녔으나, catechin의 양이 적다고 판단되어 배제하였다. 이와 같이 여러 조건으로 추출 한 결과 total catechin의 양이 가장 많았으며 맛과 향이 우수하였던 5분간 1차 추출 후, 다시 10분간 2차 추출한 조건을 추출 조건으로 선택하였다.

(다) 온도별 추출

2차 추출한 것 중 맛이 좋고, total catechin이 가장 많았던 조건인 5min 추출 후, 다시 10분간 2차 추출 한 조건을 바탕으로 추출 온도를 설정하기 위하여 60, 70, 80 °C에서 추출하여 맛과 HPLC를 이용하여 성분 분석을 하였다 (Table 34).

Table 34. Contents of total catechin and EGCG according to extraction temperature and time

			(mg/g)
Temperature (°C)	Extraction	Total catechin	EGCG
60	First extraction (5min)	9.12	1.13
	Second extraction (10min)	19.20	4.82
70	First extraction (5min)	15.89	3.44
	Second extraction (10min)	30.82	6.95
80	First extraction (5min)	34.19	9.40
	Second extraction (10min)	40.51	8.02

높은 온도에서 추출 할수록 total catechin의 양이 많아짐을 알 수 있었다. 80°C에서 5분간 1차 추출 후 다시 10분간 2차 추출한 조건이 가장 높았다. 하지만 높은 온도에서 추출할수록 그 맛이 좋지 않았다. 쓴맛이 강하고, 마셨을 경우 입안이 텁텁해져서 그 맛이 좋지 않아 기호도가 낮았다. 70°C에서 추출한 조건 또한 catechin의 양은 많았지만, 80°C와 마찬가지로 기호도가 좋지 않았다. 그래서 catechin의 양이 적절하고 맛과 향이 좋다고 판단된 온도인 60°C를 추출 온도로 결정하였다. 하지만 1차 추출 시 보다 2차 추출하였을 경우 맛은 좋으나, 차 향기가 부족하다고 판단되었다. 그래서 온도는 60°C, 차의 양을 200mL에 3g으로 늘여 추출하기로 최종 결정 하였다.

(4) 將軍茶음료의 시제품 개발

(가) 將軍茶 증작을 이용한 시제품 개발

설정 된 추출 조건에 따라, 將軍茶 3g/200mL의 농도로 60°C에서 5분간 1차 추출 후, 그 잎을 건져내어 60°C에서 다시 10분간 추출 하였다. 추출액에는 10% Ascorbic acid 용액을 0.02%가 되도록 첨가하고 1% Sodium carbonate 용액을 첨가하여 pH 6이 되도록 조절 하였다. 완성된 추출액은 레토르트 포장기로 100mL씩 주입하여 포장하였으며, 포장 후 레토르트 살균기를 이용하여, 105°C, 1.5기압에서 15분간 살균하였다 (Table 35).

Table. 35. Extraction condition for *Jangguncha* beverage

Conditions		
Weight of Jung-jak		3g/200mL
Temperature		60 °C
Extraction time	First	5 min
	Second	10 min
Ascorbic acid		0.02%
pH		6.0
Sterilization		105°C, 1.5atm, 15min

결정된 조건에 따라 추출하여 포장한 將軍茶는 항당뇨 임상 시험용으로 제공되었다 (Fig. 26).



Fig. 26. Pouch products of *Jangguncha* beverage.

(나) 시판 녹차와 將軍茶의 비교

현재 시중에 판매되고 있는 녹차와 將軍茶음료의 catechin 함량을 비교하였다 (Table 36). 티백으로 판매되는 A사 제품, 잎차로 된 B사 제품, 완제품으로 판매되는 C사 제품을 將軍茶와 비교하였다.

Table 36. Catechin contents of green tea products

Sample	Total catechin	(mg/mL)
		EGCG
A사 (티백)	0.10	0.03
B사 (잎차)	0.56	0.21
C사 (녹차음료)	0.14	0.04
將軍茶	0.60	0.25

시판 녹차와 將軍茶를 비교하였을 때, 티백인 A사나 완제품으로 판매되는 C사에 비해 total catechin이나 catechin류 중 가장 많이 추출 되는 EGCG의 양을 비교하였을 때, 將軍茶가 많은 양의 catechin류를 함유하고 있음을 알 수 있었다. 잎녹차로 판매되는 B사의 경우 將軍茶와 비슷한 양의 catechin류를 함유하고 있었다. 이를 바탕으로 將軍茶는 다른 회사 제품들과 비교하였을 때, 비슷하거나 많은 양의 catechin류를 함유하고 있다는 것을 알 수 있었으며, 음료로서 개발할 경우 부족함이 없다고 사료된다.

(5) 기타 將軍茶 응용 제품의 개발

(가) 將軍茶 원료 소재의 개발

① 將軍茶 추출 농축액

將軍茶잎 추출액을 열수추출하여 진공농축한 농축액의 형태로 개발하였다 (Fig. 27a). 농축액의 최종제품 Brix(가용성성분함량, %)를 8.0% Brix로 결정하였다. 농축액의 총 catechin함량(%)은 $331.86\text{mg/g} \pm 3.53$ 으로 분석되었다. 본 농축액은 제면, 제빵 등의 반죽에 일정량 첨가하거나 아이스크림 제조 시 일정량 첨가하는 형태의 원료물질로 사용 및 적용이 가능하리라 사료된다.

(a)



(b)



Fig. 27. (a) Concentrate of Jangguncha extract and (b) Jangguncha powder.

② 將軍茶 분말

將軍茶 증작을 건조, 분쇄한 후 50mesh의 체를 통과한 분말을 사용하여 다양한 식품에 적용하였다 (Fig. 27b).

(나) 將軍茶 소재의 이용한 식품 가공

將軍茶 분말 및 추출 농축액을 이용하여 식빵, 국수, 파운드케이크를 제조하였다 (Fig. 28). 무첨가군에 비하여 조직감 및 맛에서 큰 차이가 없어 다양한 식품에 적용하기가 용이할 것으로 사료된다.



Fig. 28. Application of *Jangguncha* concentrate and powder to various foods.

(a) bread, (b) nooble, and (c) pound cake.

3. 장군차의 당뇨병성 신증 개선효과 및 작용 메커니즘 규명

가. 세포모델계에서 oxalate로 유도된 독성으로부터 將軍茶의 신세포보호 효과

(1) 수산에 의한 신세뇨관 세포독성 효과

수산을 72시간 동안 MDCK 세포주에 첨가하여 배양한 결과 수산의 농도가 증가함에 따라 생존한 MDCK세포수가 감소함을 알 수 있어 수산 농도가 증가함에 따라 신상피세포에 대해 독성을 가지고 있음을 확인하였다(Fig. 29).

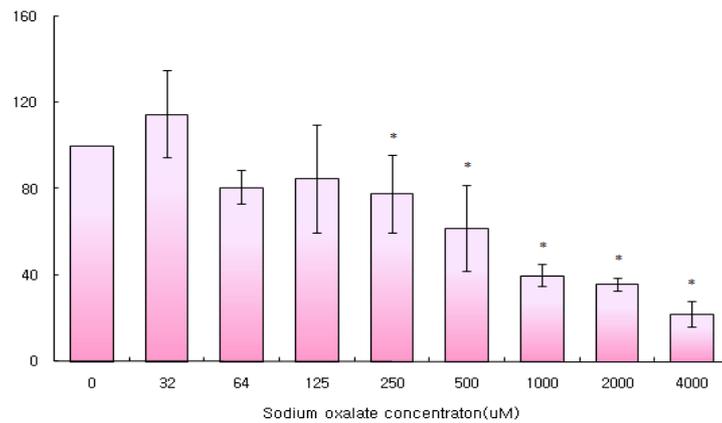


Fig. 29. Cell survival rate after the culture of MDCK cells with various concentrations of oxalate by MTT assay.

(2) 將軍茶의 신세뇨관세포에 대한 영향

250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하에서 세작 및 우전 추출물의 MDCK 세포주에 대한 세포 독성 효과는 없었으며 오히려 고농도에서는 세포 성장 효과가 관찰되었다(Fig. 30).

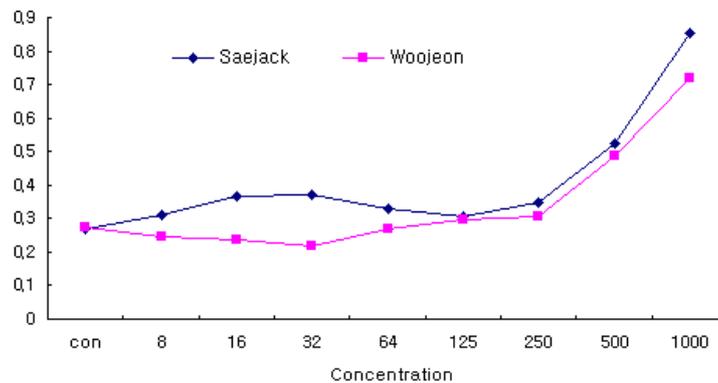


Fig. 30. Cell survival rate after the culture of MDCK cells with various concentrations of Saejack and Woojeon by MTT assay.

(3) 將軍茶에 의한 신세뇨관세포독성 억제 효과

將軍茶 세작 추출물은 각 농도(10, 25, 50 μ M)에서 87% 이상의 세포생존율을 나타내었다 (Fig. 31).

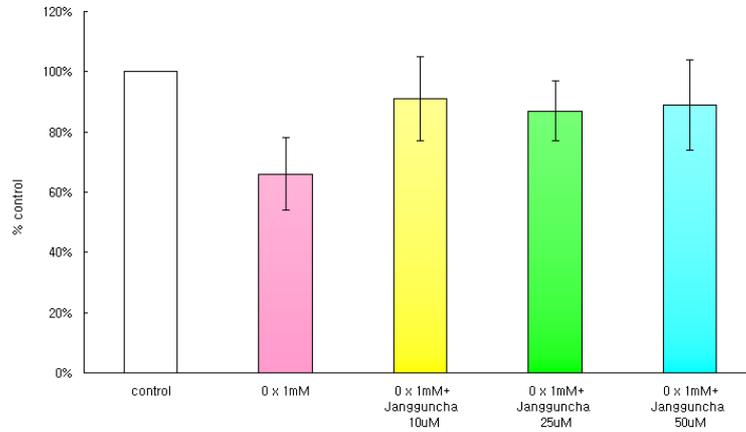


Fig. 31. Cell survival rate after the culture of MDCK cells with various concentrations of Saejack and 1mM oxalate by MTT assay.

나. 신장병 동물모델계에 있어서 신장보호효과 규명

(1) 4주간의 체중 변화

각 군당 식이 섭취량과 음수량은 차이가 없었고 체중도 차이가 없었다(Fig. 32).

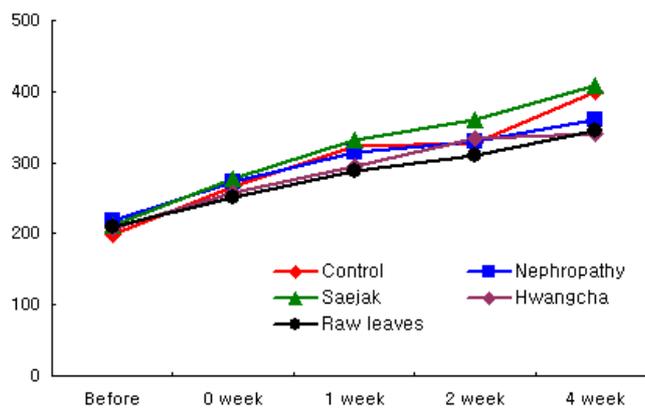


Fig. 32. Body weight of each group.

(2) 24시간 요 creatinine clearance

각 군당 24시간 요량은 차이가 없었으며, gentamycin을 피하주사한 신손상군의 24시간 요 크레아티닌이 정상대조군에 비해 통계적으로 유의하게 감소하여 신손상을 확인할 수 있었으며 같은 신손상군에서 세작과 황차, 생잎을 투여하였을 때 요 크레아티닌 수치가 상승되어 將軍茶의 신손상억제효과를 알 수 있었다. 將軍茶 종류 중 생잎을 복용한 그룹에서 제일 신손상 보호효과가 뛰어났음을 알 수 있었다(Fig. 33).

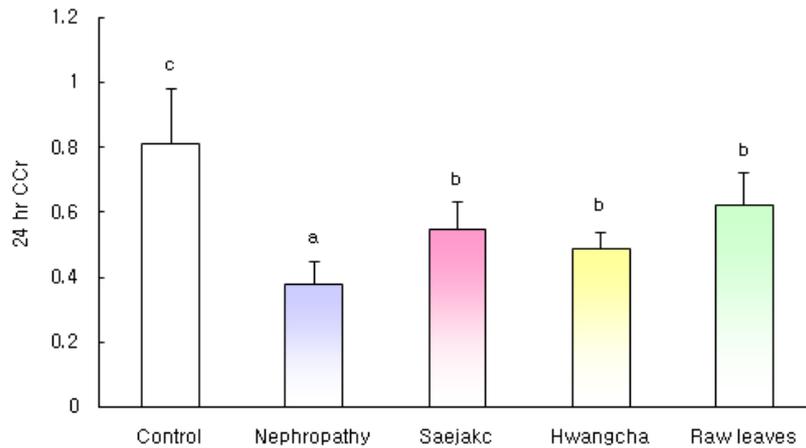


Fig. 33. 24 hour urine creatinine clearance according to each group.

(3) 24시간 NAG

Gentamycin을 피하주사한 신손상군의 24시간 NAG가 정상대조군에 비해 현저하게 상승하여 신손상이 일어났음을 확인할 수 있었으며 같은 신손상군에서 세작과 황차, 생잎을 투여하였을 때 NAG가 통계적으로 유의하게 감소하여 신손상 보호효과가 생잎을 복용한 군에서 뛰어남을 알 수 있었다(Fig. 34).

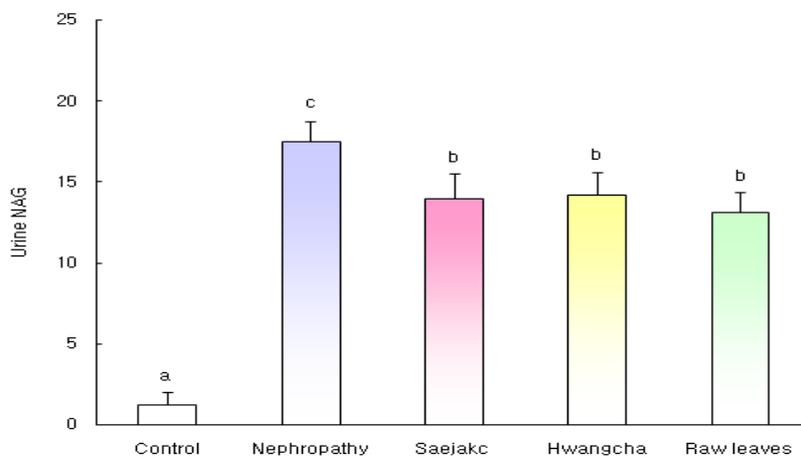


Fig. 34. 24 hour urine NAG activity according to each group.

(4) 24시간 GGT

Gentamycin을 피하주사한 신손상군의 24시간 GGT가 정상대조군에 비해 현저하게 상승하여 신손상이 유발되었음을 확인할 수 있었으며 같은 신손상군에서 세작과 황차, 생잎을 투여하였을 때 모두 통계적으로 유의하게 GGT 생산이 감소하여 將軍茶의 신장보호효과를 확인할 수 있었으며 將軍茶중 세작이 GGT 생성을 가장 크게 막아주었다(Fig. 35). 동물모델계 실험에 將軍茶는 신손상군에 비해 24시간 요 크레아티닌치가 높았으며 요중 NAG와 GGT가 감소함을 보여주어 확실한 신장보호효과가 있음을 알 수 있었으며 일반적으로 상업화가 되지 않는 생잎도 큰 신장보호효과가 있음을 알 수 있었다.

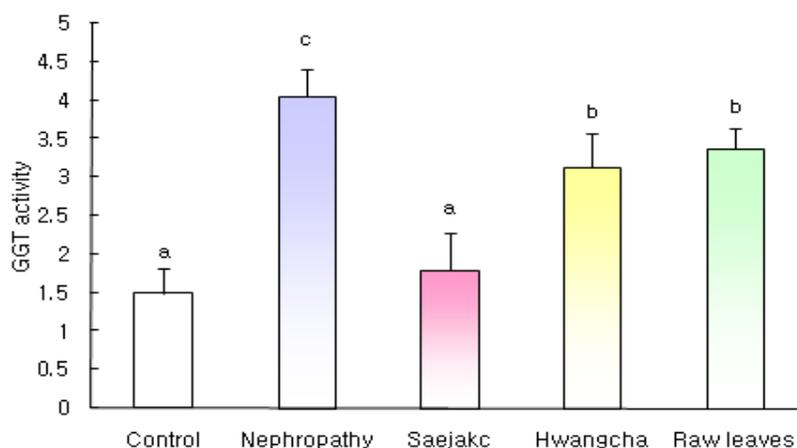


Fig. 35. 24 hour urine GGT activity according to each group.

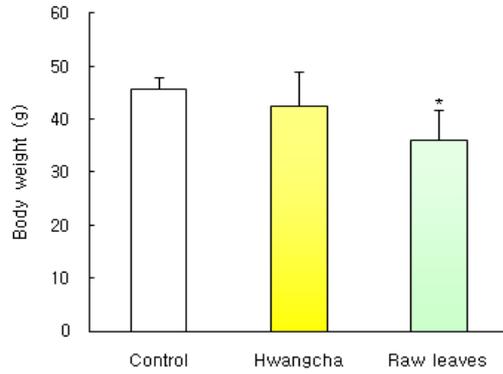
(5) 백서 신장의 광학현미경하 관찰

각 군의 사구체 조직을 광학현미경 소견으로 관찰한 결과 모두 사구체 조직은 잘 유지되고 있었으며, 군간의 특별한 차이는 발견하지 못하였다.

다. 제2형 당뇨동물모델에서 將軍茶의 糖尿病性 腎症 개선효과

(1) 체중 변화

Db/db mouse에 있어서 대조군, 황차군, 생잎군의 평균 체중은 각각 45.7 ± 2.3 g, 42.5 ± 6.4 g, 36.2 ± 5.5 g으로 나타나, 생잎군이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 황차군의 체중은 대조군과 유의적 차이가 없었다(Fig. 36).



*p<0.05 relative to control

Fig. 36. Body weight of mice after the treatment for 14 weeks.

(2) 24시간 요검사를 통한 糖尿病性 腎症 억제 효과

신기능 정도를 알기 위해 24시간 뇨량을 측정하고 혈액과 뇨의 creatinine 농도를 측정한 후, 24시간 creatinine 청소율을 계산하였다. 糖尿病性 腎症 지표인 24시간 요중 microalbumin 및 protein 총량을 화학적 분석법을 이용하여 측정한 결과, 대조군, 황차군, 생잎군의 24시간 요량은 각각 499±313 ul, 1192±982 ul, 930±624 ul로 유의적인 차이는 없었다(Fig. 37).

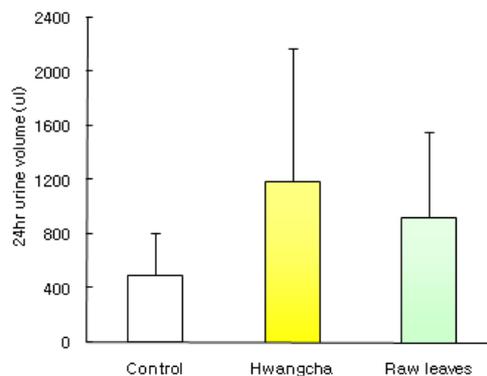
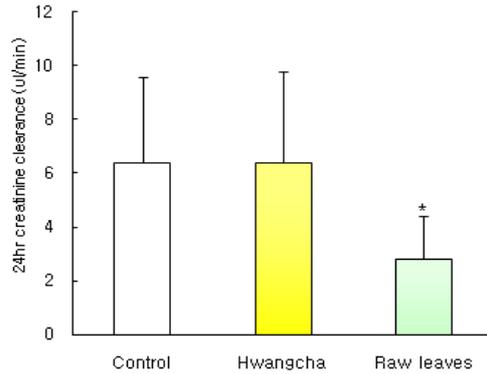


Fig. 37. Total 24 hour urine volume.

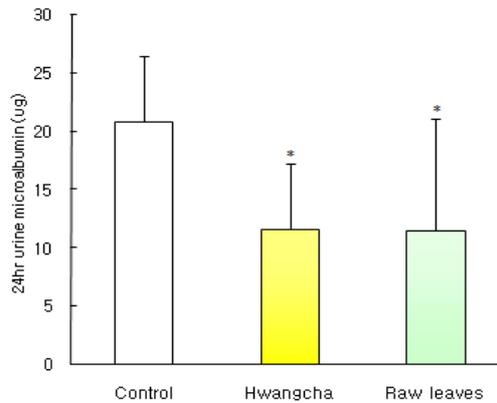
대조군, 황차군, 생잎군의 24시간 creatinine 청소율은 각각 6.4±3.2 ul/min, 6.4±3.4 ul/min, 2.8±1.6 ul/min으로 나타나, 황차군의 평균 24시간 creatinine 청소율은 대조군과 비슷했으나 생잎군은 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다(p<0.05, Fig. 38). 따라서 將軍茶 생잎은 糖尿病性 腎症에 의한 hyperfiltration을 감소시켜 糖尿病性 腎症 저하 효과를 나타내는 것으로 사료된다.



*p<0.05 relative to control

Fig. 38. 24 hour urine creatinine clearance of db/ db mice.

대조군, 황차군, 생잎군의 24시간 microalbumin 수치는 각각 20.8 ± 5.7 ug, 11.6 ± 5.6 ug, 11.5 ± 9.6 ug으로 나타나 황차군 및 생잎군이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$, Fig. 39). 이는 將軍茶 황차 및 생잎은 糖尿病性 腎症에 의한 hyperalbuminuria를 감소시켜 糖尿病性 腎症 개선 효과가 있는 것으로 사료된다.



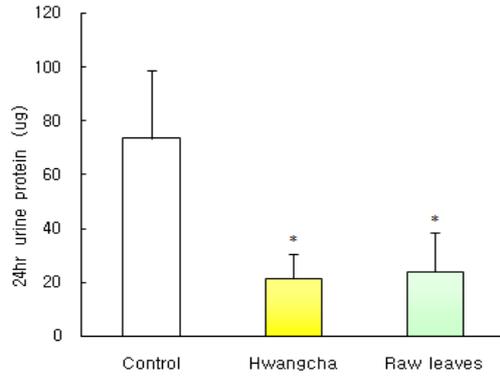
*p<0.05 relative to control

Fig. 39. 24 hour urine creatinine clearance of db/ db mice.

대조군, 황차군, 생잎군의 24시간 총 단백량은 각각 73.3 ± 25.2 ug, 21.4 ± 9.2 ug, 24.1 ± 14.0 ug으로 대조군에 비해 황차군 및 생잎군이 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.01$, Fig. 40). 糖尿病性 腎症은 당뇨에 의한 신장 조직의 변화에 의해 발생하는 증상으로 당뇨가 장기간 지속되면 우선적으로 신기능의 가장 기본적인 사구체 조직의 변화가 발생한다. 그 결과 임상적으로 나타나는 단백뇨가 가장 특징적이며 또한 조직학적 변화에 의한 신비대가 발현된다.

血糖의 조절 정도는 당뇨로 인한 합병症의 발생을 유발하는 가장 중요한 위험인자이다 (Unger J. 2007). 이로 인하여 인슐린이나 각종 경구 血糖강하제 이외에도 血糖 조절 효과가 있는 기능성 식품에 대한 관심은 날로 증가하고 있다 (Chang *et al.*, 2007). 그 중 가장

주목받고 있는 식품이 바로 녹차이다. 녹차의 항산화, 항암 효과가 보고되고 있으며, 최근에는 내당능 장애를 호전시킴으로써 심혈관계 질환의 예방 효과가 있다는 연구 결과도 보고되고 있다 (Cabrera *et al.*, 2006; Crespy *et al.*, 2004; Frei *et al.*, 2003; Thielecke *et al.*, 2009). 녹차의 일종인 將軍茶의 황차 및 생잎 또한 將軍茶 황차와 생잎은 당뇨병성 腎症을 개선시키는 데 도움이 되는 것으로 사료된다.

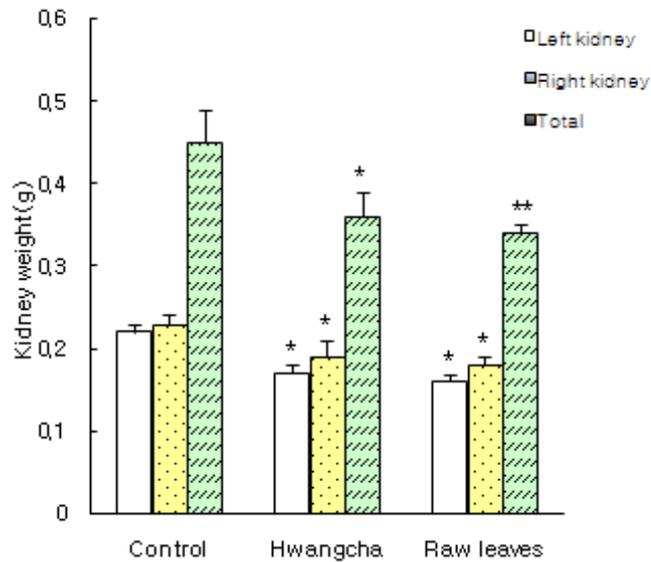


* $p < 0.01$ relative to control

Fig. 40. Total 24 hour urine protein of db/db mice.

(3) 신장조직 검사를 통한 將軍茶의 당뇨병성 腎症 개선 효과 연구

대조군, 황차군, 생잎군의 평균 신장무게는 각각 0.45 ± 0.04 g, 0.36 ± 0.03 g, 0.34 ± 0.03 g이었다. 황차군($p < 0.05$)과 생잎군($p < 0.01$)의 평균 신장 무게는 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. 이는 將軍茶 황차 및 생잎이 糖尿病성 腎症에 의한 신비대를 개선시키는 효과가 있는 것으로 사료된다(Fig. 41).



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ relative to control

Fig. 41. Mean kidney weights of db/db mice.

사구체 조직을 광학현미경 소견으로 관찰한 결과 세 군 모두 사구체 조직은 잘 유지되고 있었으나, 전자 현미경 소견에서는 세 군간 차이가 관찰되었다. 전자현미경 소견으로 관찰한 결과 대조군의 glomerular basement membrane에서 조직학적 특징인 foot process가 소실된 상태였으나(Fig. 42a), 황차군과 생잎군의 경우 foot process가 관찰되었다(Fig. 3-14b & c). Foot process의 소실은 임상적으로 단백뇨를 유발시킨다. 24시간 요검사 결과 대조군은 황차군과 생잎군보다 단백뇨가 더 높은 것으로 나타났다. 또한 황차군(b)과 생잎군(c)을 비교해보면 foot process가 생잎군에서 비교적 더 잘 유지되고 있음이 관찰되었는데, 이는 생잎 식이가 황차보다 당뇨에 의한 사구체 조직의 변성을 좀 더 예방하는 것으로 사료된다. 따라서 2형 당뇨동물 모델에 있어서 將軍茶 황차와 생잎의 섭취는 糖尿病性 腎症을 개선하였으며, 생잎의 효과가 더 우수한 것으로 사료된다. 또한 將軍茶가 血糖을 조절하는 능력이 있으며, 24시간 요검사 등에서 creatinine clearance의 감소를 막고, 요농축능이 잘 유지되도록 하며, hyperalbuminuria를 막아준다는 사실을 규명하였다. 알려진 바와 같이 단백뇨는 糖尿病性 腎症의 가장 중요한 증상이며, 이는 신사구체의 손상에 기인하는 것으로 알려져있다(Jefferson *et al.*, 2008). 기존의 연구에서도 녹차는 糖尿病性 腎症으로 인한 단백뇨를 억제하는 효과가 있음이 보고되어 있으나(Yamabe *et al.*, 2006; Yokozawa *et al.*, 2005), 본 연구에서는 전자현미경을 사용하여 將軍茶가 foot process의 소실을 억제함으로써 임상적으로 단백뇨를 호전시키는 효과를 가져온다는 사실까지 규명하였다.

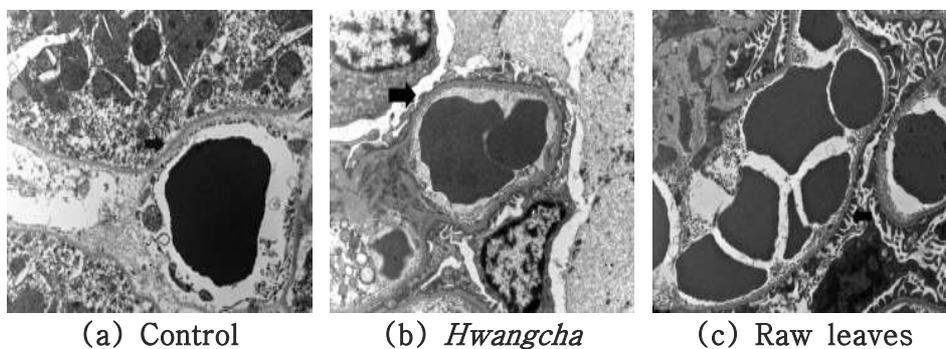


Fig. 42. Electronic microscopic pictures of glomerulous basement membrane(GBM). Black arrows show foot process of GBM.

라. 제2형 당뇨병 동물 모델에 있어서 將軍茶음료의 糖尿病신증 개선 효과 확인

(1) 체중 변화

대조군과 將軍茶음료군 사이에 14주간 식이 섭취량 및 음수량에는 차이가 없었다. 실험 개시할 때의 체중은 대조군과 將軍茶음료군이 각각 27.9 ± 1.2 g, 27.9 ± 1.3 g으로 차이가 없었으며($p=0.955$), 14주 실험 종료시의 체중 또한 각각 47.2 ± 12.9 g과 41.7 ± 9.3 g으로 통계적으로 의미 있는 차이는 보이지 않았다($p=0.414$, Fig. 43).

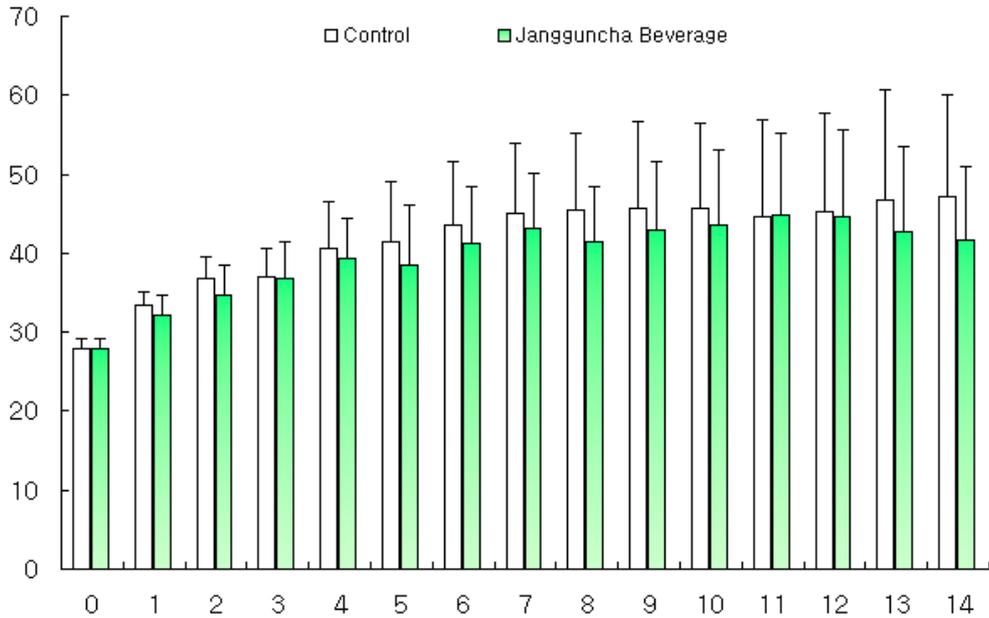


Fig. 43. Body weight of mice after the treatment for 14 weeks.

(2) 血糖 변화

血糖은 대조군과 將軍茶음료군이 각각 528.9 ± 83.5 및 403.0 ± 100.3 mg/dL로 나타나, 통계적으로 의미있는 차이가 있었다($p < 0.05$, Fig. 44).

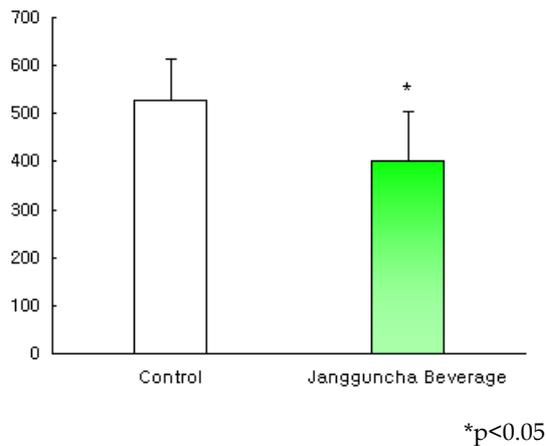


Fig. 44. Blood glucose level of mice.

(3) 24시간 소변량의 변화

24시간 소변을 3회 모아 측정한 결과 24시간 뇨량은 대조군과 將軍茶음료군에서 각각 $0.9\pm 0.6\text{mL}$, $2.9\pm 1.3\text{mL}$ ($p=0.002$)로 將軍茶음료군에서 3배 이상 뇨량이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 45). 이는 將軍茶의 diuretic effect에 의한 것으로 생각된다.

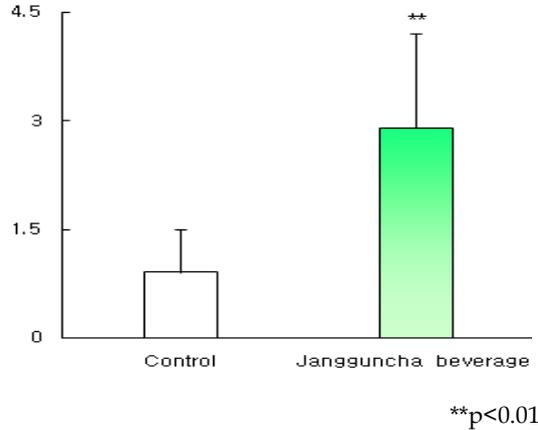


Fig. 45. 24 hour urine volume.

(4) 24시간 소변 및 혈액 검사 결과

대조군의 24시간 creatinine clearance는 0.36 ± 0.08 mL/min, 將軍茶음료군은 0.89 ± 0.12 mL/min ($p<0.001$)으로 將軍茶음료군에서 통계적으로 의미있게 creatinine clearance가 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한 각 군의 24시간 albumin 수치는 각각 48.4 ± 46.0 μg 및 $19.7\pm 9.6\mu\text{g}$ 이었으며($p=0.005$), 24시간 요중 Na 수치는 각각 60.3 ± 43.0 및 92.9 ± 39.6 μg 이었다($p=0.010$, Table 37). 이는 將軍茶가 糖尿病性 腎症 개선 효과를 가짐으로써 24시간 creatinine clearance의 감소를 막고, 요농축능이 잘 유지되도록 하며, hyperalbuminuria를 막아준다는 것을 의미하는 결과이다. 소변 검사 결과와 대조적으로 혈액 검사에서는 대조군과 將軍茶음료군 사이에 통계적으로 의미 있는 차이를 보이는 인자는 관찰되지 않았다.

Table 37. 24 hour urine and blood chemistry analysis

	Control	Jangguncha beverage	p-value
24hr urine			
CCr	0.36 ± 0.08	0.89 ± 0.12	<0.001
Albumin	48.4 ± 46.0	19.7 ± 9.6	0.005
Na	60.3 ± 43.0	92.9 ± 39.6	0.010
K	98.9 ± 38.1	108.7 ± 37.7	0.471
Cl	101.3 ± 32.3	111.0 ± 26.4	0.288
Serum			
BUN	13.8 ± 12.8	20.1 ± 5.1	0.476
Cr	0.4 ± 0.3	0.4 ± 0.2	0.833
Albumin	0.6 ± 0.8	0.6 ± 0.8	0.755
Na	137.0 ± 5.9	137.2 ± 6.0	1.000
K	5.5 ± 1.5	8.1 ± 4.7	0.164
Cl	109.8 ± 8.7	105.0 ± 12.7	0.648

(5) 신장 무게

대조군과 將軍茶음료군의 양쪽 신장 무게의 합은 각각 0.43 ± 0.03 g 및 0.33 ± 0.03 g 이었다 ($p < 0.05$). 이는 將軍茶가 糖尿病性 腎症에 의한 신비대를 개선시키는 효과가 있는 것으로 해석된다(Fig. 46).

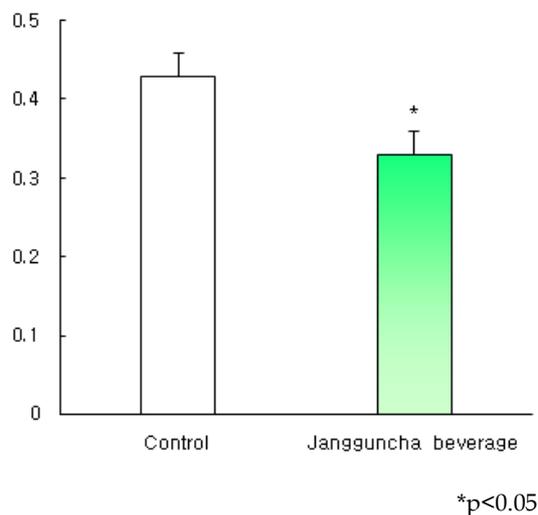


Fig. 46. Mean kidney weights.

(6) 간 조직의 지질과산화물 함량

將軍茶음료군의 간조직 지질과산화물 함량은 15.1 ± 1.6 nmol MDA/g kidney로 나타나 대조군(18.6 ± 3.2 nmol MDA/g kidney)에 비해 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05$, Fig. 47). 將軍茶음료군의 catalase 활성(7.5 ± 1.3 U/mg protein) 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 將軍茶음료군의 SOD(3.0 ± 0.6 U/mg protein)은 및 GSH-px 활성(26.9 ± 4.4 nmol/mg protein)은 대조군(2.5 ± 0.4 U/mg protein 및 23.4 ± 3.9 nmol/mg protein)과 유의적인 차이가 없었다(Table 38). 따라서 將軍茶음료는 catalase 활성을 증가시켜 활성산소종을 제거함으로써 지질과산화물 함량을 낮추어 신장조직을 산화적 스트레스로부터 보호하는 것으로 사료된다(Haron., 1991).

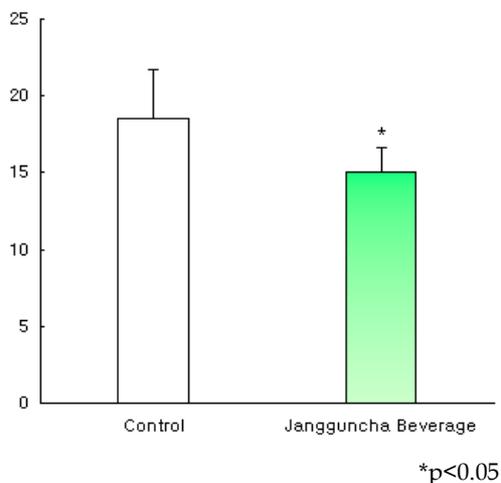


Fig. 47. Hepatic TBARS levels.

Table 38. Activities of SOD, catalase and glutathione peroxidase in the liver

Group	SOD (U/mg protein)	Catalase (U/mg protein)	GSH-Px (nmol/mg protein)
Control	2.5±0.4	5.9±1.3	23.4±3.9
<i>Jangguncha</i> beverage	3.0±0.6	7.5±1.3*	26.9±4.4

*p<0.05

마. 제2형 당뇨병환자에 있어서 將軍茶음료의 신장 보호효과 확인

(1) 소변 검사

將軍茶음료군에 있어서 將軍茶음료 섭취 전의 뇨중 albumin 배설량은 14.4±11.0 µg/min 이었으며, 12주 동안 將軍茶음료를 섭취한 후 11.6±7.9 µg/min로 나타났다(Table 39). 당뇨병환자에 있어서 미세알부민뇨(20-200 µg/min)는 초기 糖尿病性 腎症을 진단할 수 있는 지표로 사용된다. 미세알부민뇨는 알부민배설량이 20-200 µg/min로 정의되는데, 본 연구에 참여한 대조군 및 將軍茶음료군 중 각각 3명의 환자가 미세알부민뇨를 나타내었다. 평균 뇨중 알부민 배설량은 대조군, 將軍茶음료군 모두 시험 전, 후에 유의적인 차이가 없었다.

Table 39. Urinary analysis of control and *Jangguncha* beverage groups

	Control group			<i>Jangguncha</i> beverage group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference ¹
Albumin excretion rate (µg/min)	13.3±11.8	13.1±12.3	0.2±2.9	14.4±11.0	11.6±7.9	2.8±4.7
Na (mmol/day)	188.4±50.3	186.3±42.8	2.1±21.0	183.1±27.4	179.4±28.7	3.7±17.2
K (mmol/day)	55.4±22.5	48.7±14.8	6.7±17.4	62.5±25.5	54.2±19.5	8.3±18.5

¹Difference between Pre and Post measurement

(2) 혈액 검사 결과 및 사구체여과율

將軍茶음료군에 있어서 將軍茶음료 섭취 전의 혈청 creatinine 농도는 0.91±0.24 mg/dL이 었으며, 12주 동안 將軍茶음료를 섭취한 후 0.90±0.25 mg/dL으로 나타났다(Table 40). 將軍茶음료군에 있어서 將軍茶음료 섭취 전의 사구체여과율(Estimated GFR)은 80.1±17.6 mL/min/1.73m³로 나타났으며 將軍茶 음료를 섭취한 후 81.5±21.6 mL/min/1.73m³로 나타났다. 대조군과 將軍茶음료군 모두 혈청 creatinine, albumin, Na, K 및 estimated GFR 이 시험 전, 후에 유의적인 차이가 없었다.

Table 40. Serum analysis and GFR of control and *Jangguncha* beverage groups

	Control group			<i>Jangguncha</i> beverage group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference ¹
Na (mmol/L)	139.3±2.1	139.1±2.9	0.2±2.0	139.4 ±2.0	139.9±2.8	-0.5±2.6
K (mmol/L)	5.4±0.4	5.2±0.5	0.2±0.4	5.7±0.7	5.4±0.6	0.3±0.7
Albumin (g/dL)	4.5±0.3	4.5±0.2	0.1±0.2	4.4±0.3	4.5±0.3	-0.1±0.2
Uric acid (mg/dL)	4.9±1.4	5.3±1.6	-0.4±0.7	5.0±1.2	4.8±1.1	0.1±0.7
BUN (mg/dL)	15.8±3.5	15.6±2.1	0.2±2.5	17.3±3.4	15.8±2.9	1.5±1.9
Creatinine (mg/dL)	0.87±0.14	0.88±0.13	-0.01±0.04	0.91±0.24	0.90±0.25	0.01±0.05
Estimated GFR (mL/min/1.73m ³)	85.5±11.6	83.3±10.9	2.2±3.4	80.1±17.6	81.5±21.6	-1.5±6.3

¹Difference between Pre and Post measurement

(3) 혈압

將軍茶음료군의 수축기 혈압은 시험 전, 후 각각 145.2±22.2 mmHg, 137.4±19.2 mmHg로 將軍茶음료 섭취 후 유의적으로 감소하였다(7.8±7.3 mmHg, p<0.05, Table 41). 將軍茶음료군의 이완기 혈압은 시험 전 82.7±9.1 mmHg이었고, 시험 후 78.7±9.1 mmHg로 유의적으로 감소하였다(4.0±4.3 mmHg, p<0.05). 대조군의 수축기 및 이완기 혈압은 시험 전, 후에 유의적인 차이가 없었다. 고혈압의 조절은 糖尿病性 腎症의 예방과 개선이 있어서 매우 중요한 요소다. 따라서 將軍茶음료의 섭취는 혈압을 감소시켜 신장 보호효과에 기여할 것으로 사료된다.

Table 41. Blood pressure of control and *Jangguncha* beverage groups

	Control group			<i>Jangguncha</i> beverage group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference ¹
Systolic blood pressure (mmHg)	138.0±15.5	136.8±11.7	1.2±5.8	145.2±22.2	137.4±19.2	7.8±7.3 ^{*2}
Diastolic blood pressure (mmHg)	84.5±6.4	84.2±6.6	0.3±3.4	82.7±9.1	78.7±9.1	4.0±4.3 [*]

¹Difference between Pre and Post measurement

²Differences of *Jangguncha* beverage group and control group are significantly different at p<0.05.

(4) 지질과산화물 및 항산화 효소계 활성화에 미치는 영향

將軍茶음료 섭취가 항산화능에 미치는 영향은 Table 42에 나타내었다. 將軍茶음료군에 있어서, 시험시간 전의 혈청 TBARS 농도는 $5.51 \pm 0.55 \mu\text{mol MDA/L}$ 이었으나, 섭취 후 유의적으로 감소하여($0.39 \pm 0.43 \mu\text{mol MDA/L}$, $p < 0.05$) $5.12 \pm 0.45 \mu\text{mol MDA/L}$ 로 나타났다. 시험 전 將軍茶음료군의 적혈구 catalase 활성은 $131.9 \pm 18.4 \text{ K/gHb}$ 이었으며, 시험 후 $139.5 \pm 14.4 \text{ K/gHb}$ 로 유의적으로 증가하였다($-7.6 \pm 11.7 \text{ K/gHb}$, $p < 0.05$). 將軍茶음료군에서 SOD 및 GSH-Px 활성은 시험 전, 후에 유의적인 차이가 없었다. 대조군의 경우 시험기간 전, 후에 혈청 TBARS 농도, 적혈구 catalase, SOD 및 GSH-px 활성은 시험 전, 후 유의적인 차이가 없었다. 將軍茶 섭취로 인한 catalase의 활성 증가는 활성산소종을 효율적으로 제거하여 지질 과산화물을 감소시킨 것으로 사료된다. 당뇨병자에 있어서 지질과산화는 糖尿病性 腎症을 포함하는 당뇨合併症을 유발하는 주요 인자이므로, 將軍茶음료의 장기간 섭취는 당뇨 合併症의 예방 및 치료에 기여할 것으로 사료된다.

Table 42. Antioxidant effect of Jangguncha beverage control and Jangguncha beverage groups

	Control group			Jangguncha beverage group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference ¹
TBARS ($\mu\text{mol MDA/L}$)	5.57 ± 0.77	5.64 ± 0.78	-0.07 ± 0.39	5.51 ± 0.55	5.12 ± 0.45	$0.39 \pm 0.43^{*2}$
SOD (U/mgHb)	0.90 ± 0.18	0.98 ± 0.16	-0.08 ± 0.17	0.94 ± 0.11	1.18 ± 0.31	-0.24 ± 0.23
Catalase (K/gHb)	138.7 ± 21.6	129.6 ± 15.6	9.1 ± 19.7	131.9 ± 18.4	139.5 ± 14.4	$-7.6 \pm 11.7^*$
GSH-Px (U/gHb)	25.8 ± 4.5	25.3 ± 3.9	0.5 ± 2.9	26.2 ± 3.5	28.6 ± 3.5	-2.4 ± 2.4

¹Difference between Pre and Post measurement

²Differences of Jangguncha beverage group and control group are significantly different at $p < 0.05$.

바. 將軍茶의 糖尿病性 腎症 개선 메커니즘 규명

(1) 세포고사 억제에 의한 糖尿病性 腎症 개선 효과 확인

Viable MDCK cell의 relative fraction은 1mM의 sodium oxalate를 처리한 경우, 40% 이상 감소하는 것으로 확인되었다. 그러나 각각 10, 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 將軍茶 증작 추출물을 넣어주자 viable cell의 relative fraction은 각각 66.0 및 75.10%로 통계적으로 의미있게 증가하였다 ($p < 0.05$, Fig. 48). 이는 將軍茶 추출물이 sodium oxalate에 의하여 유발된 세포고사를 억제하는 효과가 있음을 의미한다. 본 연구에서는 將軍茶가 oxalate로 유도된 독성으로부터 신세포를 보호하는 효과가 있음을 규명하였다. 이는 정 등(Jeong *et al.*, 2006)이 녹차가

NRK-52E cell에서 oxalate에 의해 유도된 free radical stress로부터 보호하는 효과가 있다고 보고한 것과 일치한다.

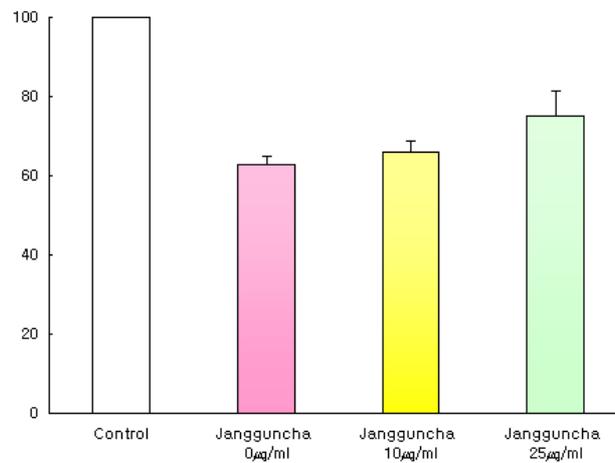


Fig. 48. MDCK cell viability upon concentration of *Jangguncha* extracts following exposure to sodium oxalate

(2) MDA assay

대조군에서는 MDA production이 시간이 경과함에 따라 증가하였으나, 將軍茶음료군에서는 시간이 경과함에 따라 MDA production이 감소하였다($p < 0.05$, Fig. 49). 이는 將軍茶가 sodium oxalate에 의해 발생하는 polysaturated fatty acid의 peroxidation을 저해함으로써 항산화효과를 가짐을 의미한다. 따라서 將軍茶 catechin은 항산화효과를 나타내어 당뇨병 동물에 있어서 糖尿病性 腎症 개선효과를 나타내는 것으로 사료된다.

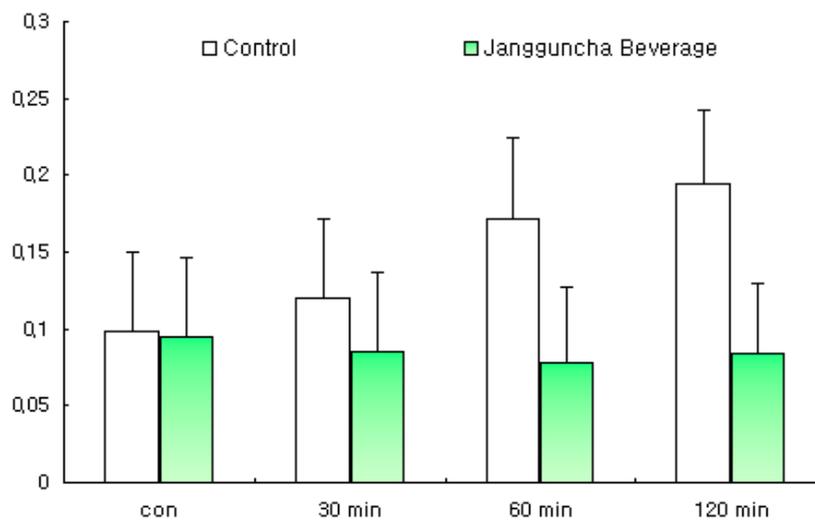


Fig. 49. MDA levels following exposure to sodium oxalate and *Jangguncha* extracts according to period.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연차별 목표 달성도

1. 1차년도

(점선: 계획, 실선: 달성도)

연구내용	추진 일정												결과 (%)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
제1세부과제:														
○ <i>In vitro</i> 에서 탄수화물 소화효소 저해활성 측정														100
○ 동물모델계에서 혈당 저하효과 조사														100
○ 세포모델계에서 포도당 transport 개선효과 규명														100
제2세부과제:														
○ 장군차의 수확시기별 제품별 폴리페놀 성분 분석														100
○ 혈당저하 및 신세포 보호효과가 우수한 용매추출분획 선별														100
○ 생리활성 성분의 1차 정제														100
협동과제:														
○ 세포모델계에서 장군차의 신세포보호효과 규명														100
○ 동물모델계에서 신장보호효과 규명														100
총진도율														100

2. 2차년도

(점선: 계획, 실선: 달성도)

연구 내용	추진 일정												결과 (%)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
제1세부과제:														
○ 제2형 당뇨동물모델에 있어서 항당뇨 효능 조사														100
○ 당뇨합병증 개선효과 조사														100
제2세부과제:														
○ 항당뇨 및 신장보호 활성성분 분리														100
○ 유용성분의 구조분석														100
○ 유효활성성분의 안정성 및 생리활성 특성 규명														100
협동과제:														
○ 제2형 당뇨동물 모델에 있어서 장군차의 당뇨병성 신증 개선효과 조사														100
○ 신장 보호 효과 규명														100
총 진도율														100

3. 3차년도

(점선: 계획, 실선: 달성도)

연구내용	추진 일정												결과 (%)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
제1세부과제:														
○ 장군차 추출물의 단기 안전성 조사														100
○ 제2형 당뇨병환자에 있어서 개발된 장군차음료의 항당뇨 효능 확인														100
○ 당뇨합병증 예방효과 규명														100
제2세부과제:														
○ 유효활성성분의 추출조건 최적화														100
○ 장군차음료 및 가공제품 개발														100
협동과제:														
○ 제2형 당뇨동물 모델계에서 시제품의 당뇨병성 신증 개선효과 규명														100
○ 제2형 당뇨병환자에 있어서 시제품이 신장기능에 미치는 효과 규명														100
○ 세포모델계에서 당뇨병성 신증 개선 메커니즘 규명														100
총 진도율														100

제 2 절 연구개발목표의 달성도

1. 연구평가의 착안점 및 달성도

구 분	평가의 착안점, 척도 및 달성도		
	착 안 사 항	척도 (점수)	달성도 (점수)
최종평가	○ 장군차의 혈당조절 효과	25	25
	○ 장군차의 당뇨병성 신증 개선효과	20	20
	○ 유효활성성분의 분리 및 동정	20	20
	○ 활성성분의 단기 안전성 및 가공적성 규명	10	10
	○ 장군차 함유 가공식품의 개발 및 기능성 확인	25	25
총 점		100	100

가. 장군차의 혈당조절 효과

장군차 세작, 황차, 생잎 추출물을 이용하여 동물모델계에서 혈당저하 효과를 규명하였음. STZ-유발 당뇨쥐에 있어서 식후 30, 60, 90, 180분에 혈당 증가치는 세작, 황차, 생잎 추출물군이 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났으며, 식후 혈당변화 곡선의 면적 또한 세작, 황차, 생잎 추출물 투여군이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였음($p < 0.05$). 세포모델계에 있어서 장군차 우전, 세작, 황차 및 생잎 추출물은 glucose uptake를 증가시키는 것으로 나타났음. 제2형 당뇨동물에 있어서 장군차 세작, 황차, 생잎의 섭취는 체중을 유의적으로 감소시켰고, 당화헤모글로빈 농도와 공복혈당, 혈장의 중성지방 및 콜레스테롤 농도를 유의적으로 감소시켰음. 세작, 황차, 생잎군의 소장 maltase 활성이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였음. 세작, 황차, 생잎군의 간조직 TBARS 함량은 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며($p < 0.05$), SOD활성은 유의적으로 증가하였음($p < 0.05$). 세작군, 생잎군의 간조직의 catalase 활성은 대조군에 비해 유의적으로 증가하였음. 제2형 당뇨환자를 대상으로 장군차음료 시제품의 항당뇨 효능을 규명하였음. 제2형 당뇨환자에 있어서 장군차음료의 섭취는 혈당 및 혈청 총콜레스테롤 농도를 유의적으로 감소시키고 인슐린저항성을 개선시켰음($p < 0.05$). 따라서 장군차의 섭취는 혈당 및 이상지혈증을 개선시켜 당뇨병 및 당뇨합병증 개선 효과가 우수할 것으로 사료됨.

나. 장군차의 당뇨병성 신증 개선효과

Gentamycin 투여로 신손상을 유도한 흰쥐에 있어서 장군차 세작, 황차, 생잎의 섭취는 요크레아티닌 수치를 유의적으로 증가시켰고, GGT 및 NAG를 유의적으로 감소시켰음($p < 0.05$). 제2형 당뇨 동물에 있어서 장군차 황차, 생잎의 섭취는 24시간 creatinine 청소율 및 microalbumin 수치, 총 단백량을 유의적으로 감소시켰으며, 신장 사구체 조직의 변성을 예방하는 것으로 나타났음. 제2형 당뇨동물 모델계에 있어서 장군차음료의 섭취는 요

중 creatinine clearance 및 Na 수치를 유의적으로 증가시켰고, albumin 수치를 유의적으로 감소시켰음($p < 0.05$). 장군차음료는 신장 조직의 TBARS 함량을 유의적으로 감소시키고, catalase 활성을 증가시켜 항산화효과를 나타내었음($p < 0.05$). 제2형 당뇨병환자에 있어서 장군차 음료의 섭취는 최고혈압 및 최저혈압을 감소시키고 또한 혈청 지질과산화물 농도를 유의적으로 감소시켰으며, 적혈구 catalase 활성을 유의적으로 증가시켰음($p < 0.05$). 신세포 모델계에 있어서 장군차 추출물은 세포고사를 억제하는 효과를 나타내었고, MDA 생성을 감소시켰음. 따라서 장군차는 혈압을 조절하고 항산화 활성이 우수하여 당뇨병성 신증 개선에 효과를 나타내는 것으로 사료됨.

다. 유효활성성분의 분리 및 동정

Catechin의 HPLC 분석방법을 확립한 후 장군차에 포함된 생리활성 성분인 catechin의 함량을 분석하였음. 장군차의 제품별(우전, 세작, 중작, 대작, 황차) 및 가공하지 않은 생잎의 catechin 함량을 분석한 결과 우전이 1g 당 124mg의 총 catechin을 함유하여 가장 높았으며 세작, 중작, 대작은 총 catechin 양이 유사하였으나 EGCG의 양은 우전>세작>중작>대작의 순서로 많았음. 장군차와 보성녹차, 하동녹차와 catechin 함량을 제품별로 비교하였을 때 산지와 제품에 따라 다소간의 함량 차이는 보이지만 큰 차이는 없는 것으로 확인되었음. 장군차의 생리활성물질을 분리하기 위하여 장군차를 메탄올로 추출한 후 여러 가지 용매(헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올)를 이용하여 계통분획을 하였음. 각 분획의 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, 항산화활성, 타이로시네이즈 저해활성, 알파글루코시다제 저해활성을 측정하였으며 이 중 가장 활성이 좋은 에틸아세테이트 분획의 성분을 분석한 결과 폴리페놀류가 다량 함유되어 있는 것을 확인하였음. 그 중 가장 많은 양이 포함된 EGCG의 알파글루코시다제 저해활성을 inhibition kinetics를 수행하여 확인한 결과 경쟁적 저해(competitive inhibition)을 보였으며 K_i 값은 4.94 nM로 상당히 낮아 당뇨병환자의 혈당상승 저해 효과가 클 것으로 판단되었음. 또한, 장군차 잎의 크기별, 시기별 catechin 함량을 분석하여 비수확기와 부산물로 버려지는 차잎의 다양한 용도로의 활용가능성을 제시하였음.

라. 활성성분의 단기 안전성 및 가공적성 규명

장군차음료 가공 시 가열 공정에 따른 catechin의 손실을 줄이기 위하여 ascorbic acid를 첨가한 후 고온(100°C)에서 열처리하였을 때 catechin 보호 효과를 확인하였음. 장군차 추출 후 고온(100°C)에서 30분간 가열처리를 하였을 때 총 catechin 양은 약 30% 정도 감소하였으나 ascorbic acid를 첨가할 경우 농도 의존적으로 catechin의 손실을 방지할 수 있었으며 1.0mg/mL 이상 첨가할 경우 열처리에 의한 catechin의 손실이 거의 없었음. Ascorbic acid를 1.0mg/mL보다 높은 농도로 첨가할 경우 pH가 5.0 이하로 감소하고 신맛이 강하여 제품에 응용하기에는 적절치 않았음.

마. 장군차 함유 가공식품의 개발 및 기능성 확인

여러 가지 조건을 확립하여 장군차음료를 개발하였으며 이를 이용하여 당뇨병환자의 항당뇨 효능을 실험하였음. 장군차의 최적 추출 조건은 200mL 당 중작 3g을 60°C에서 5분간 1차 추출한 후 다시 10분간 2차 추출하여 제조하였으며 산화방지 효과와 catechin 성분의 보호

효과를 위하여 0.02%의 ascorbic acid를 첨가하였음. 장군차음료 중 카페인의 감소를 위하여 2차 추출법, 원료 잎의 열처리법, 추출액의 pH 조절법, 효소처리법, 이산화탄소 유체 추출법 등의 실험을 수행하였으며 각 처리 방법에 따라 다소간의 차이는 있지만 카페인이 다소 감소되는 것을 확인할 수 있었음. 그러나 카페인의 감소폭이 크지 않았으며 음료제조 공정의 편의 상 2차 추출법을 시제품에 응용하였음. 제2형 당뇨병동물모델 및 제2형 당뇨병환자에 있어서 장군차음료의 섭취는 혈당 및 고지혈증, 혈압 개선효과, 항산화효과 및 신장보호 기능이 우수한 것으로 나타났음. 또한 기타 제품에 원료소재로 응용할 수 있는 장군차 추출 농축액을 제조하였음.

제 3 절 관련분야 기여도

1. 기술적 측면

- 가. 장군차의 생리활성을 입증하여 특허 2건을 출원하였으며 1건을 등록하였음. 또한 등록된 특허 '장군차 추출물을 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 조성물'은 김해장군차영농조합법인에 기술이전을 실시하였음.
- 나. 체계적인 연구가 거의 전무한 장군차의 항당뇨 효과 및 당뇨병성 신증 개선효과를 규명하였고 활성성분을 분리·동정하여 장군차에 대한 기초자료를 제공하였음.
- 다. 체계적인 연구가 없었던 장군차 제품에 대한 catechin의 함량을 분석하여 데이터베이스의 기초 자료를 제공하였음.
- 라. 장군차 잎의 크기별, 시기별 catechin 함량을 분석하여 비수확기 및 부산물로 얻어지는 차잎의 다양한 활용에 대한 기초 자료를 제공하였음.
- 마. 장군차음료의 카페인을 감소시키기 위한 다양한 방법을 시도하여 이에 대한 산업화 적용 가능성을 제시하였음.
- 바. 혈당 조절 및 당뇨병성 신증 등의 당뇨합병증 예방효과가 우수한 소재를 개발하였음.
- 라. 당뇨병 환자가 지속적으로 섭취할 수 있는 부작용 없고 값이 저렴한 혈당 조절 및 당뇨합병증 개선용 음료를 개발하였음.

2. 경제 산업적 측면

- 가. 장군차를 베이스로 한 항당뇨, 신장보호 기능성 제품 개발의 기초자료를 제공하여 고부가가치 제품의 개발에 응용할 수 있는 계기를 마련하였음.
- 나. 장군차의 생리활성 우수성을 홍보하여 장군차 소비를 증가시키고 농가 소득 증가에 기여하며 재배농가를 확산하는데 기여할 것으로 사료됨.
- 나. 연구 개발에 근거하여 다양한 기능성 제품을 개발할 경우, 수입대체 효과 및 당뇨환자의 의료비 절감에 기여할 것으로 기대됨.
- 라. 장군차는 김해 지역의 특산물인 전통차로서 기존의 가야시대 전통문화와 접목시킬 경우 관광자원으로서의 가치가 충분할 것으로 기대됨.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구성과

1. 국제학술회의 발표

초록제목	학회기관	발표연도
Hypoglycemic effect of green tea in an animal model of type 2 diabetes mellitus	IUFoST/중국	2008

2. 국내학술회의 발표

초록제목	학회기관	발표연도
α -Glucosidase inhibitory activities of various kinds of <i>Jangguncha</i>	한국식품과학회 학술대회	2006
신세노관세포인 MDCK 세포주에서 장군차의 수산에 의한 세포 독성 효과 연구	대한비뇨기과학회 학술대회	2006
녹차의 일종인 장군차의 신장보호효과 연구: 생체 내외 실험	대한비뇨기과학회 학술대회	2006
Analysis of catechins in <i>Jang-gun cha</i> , a green tea produced on Gimhae	한국식품영양과학회 국제심포지엄	2006
Alpha-glucosidase inhibitory activity of green tea <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	한국식품영양학회 학술대회	2006
Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of <i>Jang-gun-cha</i> extracts	한국식품과학회 학술대회	2007
Inhibitory activity of <i>Jang-gun-cha</i> extracts against yeast α -glucosidase.	한국식품과학회 학술대회	2007
Glucose uptake stimulatory activity of <i>Sejak</i> of <i>Jangguncha</i> in 3T3-L1 adipocytes	한국식품영양과학회 학술대회	2007
Effect of harvest time and leaf size on catechin contents of <i>Jang-gun cha</i> , a green tea produced in Gimhae.	한국식품영양과학회 학술대회	2007
Hypoglycemic and hypolipidemic effect of <i>Hwangcha</i> of <i>Jangguncha</i> in db/db mice	한국식품과학회 학술대회	2008
Antioxidant effect of <i>Jangguncha</i> , in an animal model of type 2 diabetes mellitus	한국식품영양과학회 학술대회	2008

3. 특허

구분	특 허 명	국가명	출원번호 / 등록번호	출원일 / 등록일
출원	장군차 추출물을 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 조성물	대한민국	10-2007-0018151	2007.02.23
출원	장군차 추출물을 유효성분으로 함유하는 당뇨 합병증의 예방 및 치료용 조성물	대한민국	10-2008-0015733	2008.02.21
등록	장군차 추출물을 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 조성물	대한민국	10-0847355	2008.07.14

4. 기술이전

구분	이전기술명	이전 기업명	이전일
기술이전	장군차 추출물을 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 조성물	김해장군차영농조합	2009.04.23

5. 논문

논문명	학술지명	저자명	비고
장군차 잎의 크기 및 수확시기에 따른 카테킨의 함량 변화.	한국식품과학회지	정유정, 이미영, 최지나, 박지민, 정철호, 김정인, 김묘정	투고중
Effect of <i>Camellia Sinensis</i> Var. <i>Assamica</i> on diabetic nephropathy: <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> experiments.	Eur J Nutr.	강민용, 박용현, 정병창, 김정인, 김현희	투고중

6. 전시회 참여

유형	행사명	전시품목	장소	활용년도
전시회	제7차 국제명차 품평한국대회	장군차 및 발효 장군차 제품	국립김해박물관	2008

7. 타 연구개발사업에의 활용

연구사업명	연구제목	연구자	활용년도
2007 김해시보조연구과제	고혈압 및 고지혈증 개선 효과를 지니는 장군차 함유 코팅쌀의 개발 및 효능 규명	김정인	2007

제 2 절 추가연구의 필요성

1. 장군차는 김해지역에서 자생하고 재배하는 대엽종의 녹차로 보성이나 하동에서 재배되는 소엽종의 차나무와는 유전적으로 다른 품종임. 가락국기 등의 고서에 따르면 장군차는 서기 48년 허황옥이 혼수로 가져온 차 씨앗을 심은 것이 유래가 되었고 김해에 예전부터 야생차 군락이 형성되어 현재까지 전해져 왔음. 그러나, 아직까지 장군차 나무의 유전적 형질 및 품종이 정확하게 규명되지 않아 이에 대한 추가 연구가 필요함.
2. 일반적으로 대엽종의 녹차는 홍차와 같은 발효차로 많이 이용되나 국내에서 발효차는 큰 인기를 얻지 못하였음. 따라서 김해의 전통차인 장군차를 이용한 대중의 입맛에 맞는 발효차의 개발 및 보급에 대한 연구가 필요함.
4. 본 연구를 통하여 장군차 음료의 혈당조절 효과에 대한 긍정적인 결과를 얻었으며, 이를 바탕으로 식품의약품안전청의 건강기능성식품에 대한 개별인정형 인증을 위한 추가 연구가 향후 수행되어야 함.
5. 장군차잎의 크기 및 계절에 따른 catechin의 함량을 분석한 결과 크기와 시기에 따라 함량의 차이가 있기는 하지만 가지치기에 의하여 생산되는 녹차잎 부산물을 재활용할 수 있는 방법을 연구하면 장군차의 활용도 및 농가소득에 이바지할 것으로 판단됨.
6. 장군차를 비롯하여 일반적인 녹차의 경우 대부분은 차나 음료로서 소비되며 기타 제과나 제빵 등에 이용되기는 하나 그 수요가 많지 않음. 건강에 좋은 장군차나 녹차의 소비 증진을 위하여 좀 더 다양한 응용 분야에 대한 연구가 필요함.

제 3 절 타 연구에의 응용

1. 장군차는 일반적인 녹차와 비슷한 양의 catechin을 함유하고 있고 강한 항산화활성을 나타내므로 식품 이외에 화장품 및 생활용품으로의 적용이 가능함.
2. 장군차는 김해 지역의 특산물인 전통차로서 그 문화적 가치가 우수함. 김해에서 발굴되는 가야시대의 유적과 함께 가야문화를 대표하는 상징으로 자리매김할 경우 중요한 관광자원으로서 가치가 충분할 것으로 판단됨.
3. 본 연구에서 장군차는 비만 및 고혈당을 나타내는 db/db mouse에 있어서 체중조절에 도움을 줄 수 있는 것으로 나타나, 향후 동물 모델 및 임상시험을 통한 항비만 효능 규명 연구에 응용할 수 있는 것으로 사료됨.

제 4 절 실용화·산업화 추진방안

1. 본 연구에서 개발한 기술을 김해장군차영농조합에 기술이전을 실시하였으며 이를 바탕으로 혈당조절용 장군차 음료를 개발, 판매하여 매출을 증대시킬 계획임.
2. 장군차를 응용한 제품을 개발하고 산업화하기 위하여 원료로서 충분한 양의 장군차가 공급되는 것이 필수적이며 이를 위하여 장군차의 생산량을 증대시킬 필요가 있음. 현재 보다 많은 농가가 장군차를 재배할 수 있는 지원 및 홍보가 필요함.
3. 본 연구에서 규명한 장군차의 생리활성을 포함한 우수성에 관한 논문, 학회발표 및 광고 등을 통하여 대외적으로 홍보하여 장군차의 매출 증대에 기여함.
4. 본 연구에서 개발한 기술을 김해장군차영농조합에 기술이전을 실시하였으며 이를 바탕으로 혈당조절용 장군차 음료를 개발, 판매하여 매출을 증대시킬 계획임.
5. 현재 식품의약품안전청에서 인정하고 있는 '고시형 건강기능식품' 중 페놀류에 녹차추출물이 포함되어 있으나 제품에 표기할 수 있는 기능성 내용은 '항산화 작용' 뿐으로 본 연구에서 규명된 당뇨예방 및 당뇨합병증 예방에 관한 개별인정형 인증을 추가로 획득할 경우 제품의 홍보 및 판매에 큰 도움이 될 것으로 판단됨.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. Streptozotocin(STZ) 유발 흰쥐에게 당뇨병성 신증을 유발한 후 녹차 폴리페놀을 섭취시킨 결과 혈장 creatinine 및 creatinine 청소율이 개선되었고, 혈당, 당화헤모글로빈 및 콜레스테롤 농도도 감소된 것으로 나타났음(Yokozawa *et al.*, 2005). 녹차 추출물을 STZ 유발 당뇨쥐에게 장기간 섭취시킨 결과 혈당조절 및 신장기능 개선 효과가 우수한 것을 확인하였음(Renno *et al.*, 2008). 당뇨병에 있어서 산화적 스트레스는 당뇨병성 신증을 초래할 수 있다고 알려져 있음. 따라서 항산화능이 우수한 것으로 보고되고 있는 녹차는 당뇨병성 신증 예방 및 개선에 효과가 있을 것으로 나타났음.
2. 녹차 추출물은 제2형 당뇨동물인 db/db mouse에 있어서 식후혈당 조절효과를 나타내었으며, 정상인에 있어서도 동일한 효과를 나타내었음(Tsuneki, 2004). Db/db mouse에 있어서 녹차 catechin의 장기간 섭취는 농도 의존적으로 공복 혈당 및 중성지방 농도를 감소시켰고, 내당능을 증가시켜 당뇨병 예방 및 치료에 도움되는 것으로 나타났음(Wolfram *et al.*, 136).
3. Caffeine을 제거하기 위하여 녹차 생잎을 열처리한 결과 녹차의 생잎을 물이 1:20(w/v)의 비율로 100°C에서 3분 동안 추출 했을 때, 83%의 caffeine이 감소하였고, 95%의 catechin이 유지되었음. 열수 처리에 의한 caffeine제거는 안전하며 비용면에서도 저렴한 방법임(Liang *et al.*, 2007).
4. Caffeine을 제거하고 catechin은 유지하기 위해 녹차 분말을 초임계 이산화탄소(SC-CO₂) 추출하였음. SC-CO₂의 양, 추출 시 첨가하는 물의 양, 추출 시간 등의 조건을 달리 하여 추출 하였는데 SC-CO₂를 333K, 300 bar에서에서 추출 시 91.5%의 caffeine이 제거되었고, 80.8%의 catechin이 남았음. Caffeine 제거를 위한 최적 조건은 SC-CO₂ 640g, 온도 323K, 압력 275bar, 추출시간 1.5시간, 첨가되는 물의 양 6g임. 그 결과 71.9%의 caffeine이 제거되었고, 67.8%의 catechin이 남아있었음(Huang *et al.*, 2007).
5. 초임계 이산화탄소를 이용하여 물과 함께 녹차로부터 caffeine 및 EGCG(epigallocatechin gallate)를 추출하였음. 추출 조건은 온도는 40-80°C, 압력은 200-400 bar, 물의 양은 4-7%의 범위가 되도록 조절하였음. 40°C, 400bar, 7wt%의 조건에서 caffeine의 수율은 54%이고, EGCG의 수율은 21%로 caffeine/EGCG은 2.57이었음. 이와 같은 결과로 볼 때 SC-CO₂와 물로 함께 녹차를 추출 할 경우 녹차로부터 caffeine을 선택적으로 추출하기에 적절한 방법임(Kim *et al.*, 2008).

제 7 장 참고문헌

1. Abei H (1984). Catalase *in vitro* in method in enzymology. Academic press. Grlando. Florida. 105:121-126
2. Bernfeld P (1955). Amylase alpha and beta. Meth Enzymol 1:149-158
3. Cabrera C, Artacho R, Gimenez R (2006). Beneficial effect of green tea - A review. J Am Coll Nutr 25:79-99
4. Chang HY, Wallis M, Tiralongo E (2007). Use of complementary and alternative medicine among people living with diabetes: literature review. J Adv Nurs 58:307-19
5. Chiu FL, Lin JK (2005). HPLC analysis of naturally occurring methylated catechins, 3"- and 4"-Methyl-epigallocatechin gallate, in various fresh tea leaves and commercial teas and their potent inhibitory effects on inducible nitric oxide synthase in macrophages. J Agric Food Chem 53:7035-7042
6. Coimbra S, Castro E, Rocha-Pereira P, Rebelo I, Rocha S, Santos-Silva A (2006). The effect of green tea in oxidative stress. Clin Nutr 25:790-796
7. Crespy V, Williamson G (2004). A review of the health effects of green tea catechins in *in vivo* animal models. J Nutr 134:3431S-3440S
8. Dahlqvist A (1964). Method for assay of intestinal disaccharidases. Anal Biochem 7:18-25
9. Frei B, Higdon JV (2003). Antioxidant activity of tea polyphenols *in vivo*: evidence from animal studies. J Nutr 133:3275S-3284S
10. Haron D (1991). The aging process: major risk factor for disease and death. Proc Natl Acad Sci USA 88:5360-5364
11. Huang KJ, Wu JJ, Hciu YH, Lai CY, Chang CJ (2007). Designed polar cosolvent-modified supercritical CO₂ removing caffeine from and retaining catechins in green tea powder using response surface methodology. J. Agric. Food Chem 55:9014-9020
12. Huiling Liang, Yueong Liang, Junjie Dong, Jianliang Lu, Hairong Xu, Hui Wang (2007). Decaffeination of fresh green tea leaf(*Camellia sinensis*) by hot water treatment. Food Chem 101:1451-1456
13. Jefferson JA, Shankland SJ, Pichler RH (2008). Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. Kidney Int 74:22-36
14. Jeong BC, Kim BS, Kim JL, Kim HH (2006). Effects of green tea on urinary stone formation: an *in vivo* and *in vitro* study. J Endourol 20:356-361
15. Kang J, Dai XS, Yu TB, Wen B, Yang ZW (2005). Glycogen accumulation in renal tubules, a key morphological change in the diabetic rat kidney. Acta Diabetol 42:110-116
16. Kim SH, Park JD, Lee LS, Han DS (1999). Effect of pH on the green tea extraction. Korean J. Food Sci Technol 31:1024-1028
17. Kim WJ, Kim JD, Kim JH, Oh SG, Lee YW (2008). Selective caffeine removal from green tea using supercritical carbon dioxide extraction. Journal of Food Engineering 89:303-309
18. Lawrence RA, Burk RF (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat

- liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71:952-958
19. Lee JM, Park SR, Lee SC (2007). Quality properties of green tea prepared with alkaline ionized water. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1043-1047
 20. Lee LS, Cha HS, Park JD, Yi SH, Kim SH (2008). High quality green tea extract production from enzyme treated fresh green tea leaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37:1025-1029
 21. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D (1999). A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: A new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 130: 461-70
 22. Marklund S, Marklund G (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47:469-474
 23. No JK, Soung DY, Kim YJ, Shim KH, Jun YS, Rhee SH, Yokozawa T, Chung HY (1999). Inhibition of Trypsinase by Green Tea Components. *Pharmacology letters* 65:241-246
 24. Obineche EN, Mensah-Brown E, Chandranath SI, Ahmed I, Naseer O, Adem A (2001). Morphological changes in the rat kidney following long-term diabetes. *Arch Physiol Biochem* 109:241-245
 25. Ohkawa H, Ohisi N, Yagi K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358
 26. Owen RW, Haubner R, Hull WE, Erben G, Spiegelhalder B, Bartsch H, Haber B (2003). Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in Carob fibre. *Food Chem Toxicol* 41:1727-1738
 27. Rahimi R, Nikfar S, Larijani B, Abdollahi M (2005). A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother* 59:365-373
 28. Salminen JP, Ossipov V, Lopoén J, Haukoja E, Pihlaja K (1999). Characterization of hydrosable tannins from leaves of *Betula pubescens* by High-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 864:283-291
 29. Siddhuraju P, Becker K (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different Agroclimatic Origins of Drumstick Tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J Agric Food Chem* 51:2144-2155
 30. Son GM, Bae SM, Chung JY, Shin DJ, Sung TS (2005). Antioxidative effect on the green tea and puer tea extract. *Korean J Food Nutr* 18:219-224
 31. Stand E, Baumgartl HJ, Füchtenbusch M, Stemplinger J (1999). Effect of acarbose on additional insulin therapy in type 2 diabetic patients with late failure of sulphonylurea therapy. *Diabetes Obes Metab.* 1: 215-220
 32. Suk JH, Kim MK, Ju JW, Han JS, Park JH (2006). The effect of green tea polyphenol on plasma glucose, lipid levels and antioxidant systems in type 2 diabetic patients. *J Kor Diabetes Assoc* 30:217-225

33. Suresh Babu K, Tiwari Ak, Srinivas PV, Ali AZ, China Raju B, Rao JM (2004). Yeast and mammalian α -glucosidase inhibitory constituents from himalayan rhubarb *rheum emodi wall.ex meisson*. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* 14: 3841-3845
34. Swain T, Hillis We (1959). Phenolic constituent of *Prunus domestical*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric* 10:63-68
35. Takara K, Otsuka K, Wada K, Iwasaki H, Yamashita M (2007). 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity and tyrosinase inhibitory effects of constituent of Sugarcane molasses. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 183-191
36. Thielecke F, Boschmann M (2009). The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome - A review. *Phytochemistry* 70:11-24
37. Tsuneki H, Ishizuka M, Terasawa M, Wu JB, Sasaoka T, Kimura I (2004). Effect of green tea on blood glucose levels and serum proteomic patterns in diabetic (db/db) mice and on glucose metabolism in healthy humans. *BMC Pharmacol* 26:4-18
38. Unger J (2007). Diagnosis and management of type 2 diabetes and prediabetes. *Prim Care* 34:731-59
39. Watanabe J, Kawabata J, Kurihara H (1997). Isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from Tochu-cha. *Biosci Biotechnol Biochem* 61:177-178
40. Wolfram S, Raederstorff D, Preller M, Wang Y, Teixeira SR, Riegger C, Weber P (2006). Epigallocatechin gallate supplementation alleviates diabetes in rodents. *J Nutr* 136:2512-2518
41. Wu MS, Yu CC, Yang CW, Wu CH, Haung JY, Hong JJ, Fan Chiang Cy, Huang CC, Leu ML (1997). Poor pre-dialysis glycaemic control is a predictor of mortality in type II diabetic patients on maintenance haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 12:2105-2110
42. Yamabe N, Yokozawa T, Oya T, Kim M (2006). Therapeutic potential of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate on renal damage in diabetic nephropathy model rats. *J Pharmacol Exp Ther* 319:228-236
43. Yao L, Caffin N, D'arcy B, Jiang Y, Shi J, Singanusong R, Liu X, Datta N, Kakuda Y, Xu Y (2005). Seasonal variations of phenolic compounds in Australia-grown tea (*Camellia sinensis*). *J Agric Food Chem* 53:6477-6483
44. Yokozawa T, Nakagawa T, Oya T, Okubo T, Juneja LR (2005). Green tea polyphenols and distary fibre protect against kidney damage in rats with diabetic nephropathy. *J Pharm Pharmacol* 57:773-780
45. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999). The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and their Scavenging Effects on Superoxide Radicals. *Food Chem* 64:555-559

주 의

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