

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(), 비공개(O) 발간등록번호(O)

기술사업화지원사업 2020년도 최종보고서

발간등록번호
11-1543000-003 175-01

보성 특화 녹차 자원을 이용한 융합형 웰니스 고부가 상품 기술 개발

2020.8.8.

주관연구기관 / 제너럴네이처(주)
협동연구기관 / 남부대학교
녹차산업연구소
(주)세원씨엔에스

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “보성 특화 녹차 자원을 이용한 융합형 웰니스 고부가 상품 개발”(개발기간 : 2017. 8. 31.~ 2019. 12. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 8. 8.

주관연구책임자 : 제너럴네이처(주)
제1협동연구책임자 : 남부대학교 산학협력단
제2협동연구책임자 : 전남농업기술원 차산업연구소
제3협동연구책임자 : ㈜세원씨엔에스



주관연구책임자 : 백진수
제1협동연구책임자 : 박상규
제2협동연구책임자 : 오봉운
제3협동연구책임자 : 임승연

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<요약문>

연구개발목표	본 과제는 전남 보성 특화자원인 녹차잎을 이용하여 산학연 융합의 집중적인 상품화 연구개발을 통하여 기능성과 기호성이 확보된 고품질의 녹차 상품을 단기간에 개발을 완료하여 제품화 및 사업화하고, 국내산 차잎의 활용도 증진, 정보 제공 등의 구축을 통해 국내 차 시장 확대와 보성산 차 산업의 활성화를 목표로 하였음.				
연구개발내용	<input type="checkbox"/> 소비자 기호에 적합한 블렌딩 차 베이스 및 소재의 품질 평가 및 후보물질 선별 <input type="checkbox"/> 고품질 블렌딩 녹차 대량생산 제조공정 정립 및 원료 표준화 <input type="checkbox"/> 신개념의 기호성 및 기능성 향상 블렌딩 녹차 레시피 개발 및 제품화 <input type="checkbox"/> 초임계를 이용한 지용성 추출 성분의 기능성 유효성분 <input type="checkbox"/> 고급지방산알콜, 토코페롤, 스쿠알렌, 폴리코사놀 등 확인 <input type="checkbox"/> 초임계 유체 추출을 이용한 지용성 폴리코사놀 및 스쿠알렌의 추출 최적화 <input type="checkbox"/> 추출된 폴리코사놀 및 스쿠알렌 성분의 안전성 및 기능성 조사 <input type="checkbox"/> 초임계 유체 추출을 이용한 지용성 폴리코사놀 및 스쿠알렌의 전임상 실험 <input type="checkbox"/> 추출된 폴리코사놀 및 스쿠알렌 성분의 임상실험 <input type="checkbox"/> 세포 및 동물실험을 통한 콜레스테롤 저하 및 혈행 개선 효과 확인 <input type="checkbox"/> 추출된 폴리코사놀 인체적용시험 <input type="checkbox"/> 개별인정형 기능성 식품 개발 (콜레스테롤 개선) <input type="checkbox"/> 차잎 슬러지에 잔존하는 지용성 성분의 추출 효율을 증가하기 위해 중자유 10%와 혼합하여 초임계 유체 추출장치를 통해 지용성 녹차잎 성분을 추출하여 유효성분을 확인 <input type="checkbox"/> 고급지방산알콜, 토코페롤, 스쿠알렌, 폴리코사놀 등을 이용한 기능성 뷰티 제품 개발				
연구개발성과	1. 보성산 녹차 이용 기호성 및 편이성이 개선된 신개념 블렌딩 차 제품 개발 (3건) 2. 녹차의 지용성 성분으로부터 기능성 식품 원료 개발 (1건) 3. 녹차로부터 초임계 추출법을 이용한 기능성 식품 개발 (1건) 4. 혈중지질개선 기능성 규명을 위한 인체적용시험 완료 (1건) 5. 음용차 제조 후 잉여자원을 이용한 뷰티 제품 개발 (5건)				
활용계획 및 기대효과	<input type="checkbox"/> 차를 이용한 새로운 제품 3건 이상을 상품화하여 새로운 차 제품의 트렌드 조성 <input type="checkbox"/> 보성산 녹차를 이용한 새로운(unique) 프랜차이즈 브랜드 제품 개발 <input type="checkbox"/> 매년 수입되는 발효차 100억시장 국산홍차로 대응 국내 차산업활성화 조기 회복 <input type="checkbox"/> 국내 커피시장 5조원시장 중 개발된 국내산 블렌딩차 산업화로 5,000억원(커피시장 10% 대체) <input type="checkbox"/> 지역 자생 식물을 이용한 고부가 기능성 식품산업 발전에 이바지 <input type="checkbox"/> 녹차 연관 제품 및 관광산업 활성화 등 1,000억원 이상 보성군 지역 경제적 효과 <input type="checkbox"/> 보성녹차 재배 농가의 수익증대 <input type="checkbox"/> 보성지역 농가들의 소득증대에 따르는 경제적 활성화에 기여 <input type="checkbox"/> 보성 관내 생산 제조 회사를 설립 가동하여 녹차의 다양한 제품 및 원료를 생산하여 사업화를 진행함.				
중심어 (5개 이내)	블렌딩 녹차	기능성 식품	기능성 뷰티 제품	폴리코사놀	초임계추출

초 록

1. 주관연구기관

녹차의 폴리코사놀 성분을 포함하고 있는 지용성물질을 이용하여 기능성화장품원료를 개발하기 위하여 녹차의 지용성물질로부터 폴리코사놀 성분분석 및 화장품제형의 항산화시험, 피부개선시험을 비롯하여 인체적용시험을 실시하여 녹차폴리코사놀성분의 화장소재를 개발하였다.

녹차추출물을 사용하여 O/W제형의 유액을 제조하고 4주 동안 관찰한 결과 색, 향, 점도의 변화는 없었으며, 0.05% (v/v%)에도 크림 제형(W/O)의 각각의 같은 농도에서보다 더 진한 녹차색을 나타내었다.

항산화시험에선 DPPH와 Hydroxyl radical, Fe^{2+} chelating activity 시험에서 각각 10000ppm의 농도에서 $18.21 \pm 0.84\%$, $25.06 \pm 2.34\%$, $77.51 \pm 0.62\%$ 의 높은 항산화효과를 보였다.

피부개선시험에선 멜라닌 생성 저해활성을 측정된 결과, 50ppm, 100ppm, 300ppm에서 각각 $92.6 \pm 1.1\%$, $89.7 \pm 2.8\%$, $85.8 \pm 1.9\%$ 로 처리 농도가 높아질수록 멜라닌 농도는 감소하는 결향을 보이거나 유의하게 감소되었다. 특히 Tyrosinase 저해활성이 10000ppm의 농도에서 $82.7 \pm 1.1\%$ 로 매우 높게 조사되었다.

녹차추출물의 안전성 시험에서 중금속 및 미생물시험에서 불검출로 확인되었다.

이를 기반으로 크림제형을 개발하였다.

크림제형으로 인체피부 일차자극시험에서 평균연령 42.1 ± 7.6 세의 건강한 여성지원자 32명을 대상으로 첩포제거 30분 및 24시간 후 관찰시점에 아무런 피부반응도 관찰되지 않았다.

인체적용시험에선 44~55세(평균연령 49.8 ± 3.0)의 여성지원자 22명을 대상으로 4주 사용 전후의 비부수분량, 탄력, 처짐(리프팅), 치밀도 및 밝기를 측정하였고, 제품의 효능 및 사용성 설문평가와 안전성 평가를 실시하였다. 그 결과,

1. 시험군 및 대조군 동질성 검정 분석

제품 사용 전의 피부 수분량, 탄력, 처짐(리프팅), 치밀도 및 밝기 값이 두 군간 유의한 차이가 없었으므로 사전 값이 동질 하다고 판단하였다($p > 0.1$).

2. 피부 수분량 분석

제품 사용 전과 비교 시 4 주 사용 후 시험군의 뺨 부위 피부 수분량이 3.76% 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$). 또한, 4 주 사용 후 피부 수분 변화량이 시험군과 대조군 간에 유의한 차이가 있어($p < 0.05$) 시험군이 대조군에 비해 피부 보습이 개선되었음을 확인하였다.

3. 피부 탄력 분석

제품 사용 전과 비교 시 4 주 사용 후 시험군의 뺨 부위 탄력 값(Area)이 10.06% 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$). 또한, 4 주 사용 후 탄력 값(Area)의 변화량이 시험군과 대조군 간에 유의한 차이가 있어 ($p < 0.05$) 시험군이 대조군에 비해 피부 탄력이 개선되었음을 확인하였다.

4. 피부 처짐(리프팅) 분석

제품 사용 전과 비교 시 4 주 사용 후 시험군의 뺨 부위 처짐(등고선) 각도가 2.19% 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 또한, 4 주 사용 후 피부 처짐 각도 변화량이 시험군과 대조군 간에 유의한 차이가 있어 ($p < 0.05$) 시험군이 대조군에 비해 피부 처짐(리프팅)이 개선되었음을 확인하였다.

5. 피부 치밀도 분석

제품 사용 전과 비교 시 4 주 사용 후 시험군의 뺨 부위 피부 치밀도가 8.69% 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$). 또한, 4 주 사용 후 피부 치밀도 변화량이 시험군과 대조군 간에 유의한 차이가 있어($p < 0.05$) 시험군이 대조군에 비해 피부 치밀도가 개선되었음을 확인하였다.

6. 피부 밝기 분석

제품 사용 전과 비교 시 4 주 사용 후 시험군의 뺨 부위 피부 밝기 값(L*)이 0.50% 유의하게 증가하였

다($p < 0.05$). 또한, 4 주 사용 후 밝기 값(L^*)의 변화량이 시험군과 대조군 간에 유의한 차이가 있어 ($p < 0.05$) 시험군이 대조군에 비해 피부 밝기가 개선되었음을 확인하였다.

7. 피부 안전성 평가

본 연구기간 동안 모든 연구대상자에게서 피부 이상반응은 관찰되지 않았다.

위 결과를 근거로 (주)제너럴네이처의 ‘녹차크림(가칭)’은 피부 보습(수분량), 탄력, 처짐(리프팅), 치밀도 및 밝기 개선에 도움을 주는 것으로 판단된다.

2. 제1 협동연구기관

본 연구팀은 제 3 협동기관인 (주)세원씨엔에스의 식품관련 사업화를 지원하기 위하여, 본 연구팀이 보유하고 있는 기술 노하우를 산학협력을 바탕으로 공유하면서 연구를 추진하였다. 특히, 녹차의 지용성물질에 대한 다양한 연구와 수용성 차 제품의 새로운 형태를 개발하기 위하여 다양한 시도와 연구를 진행하였다. 건조 차엽을 믹서기에 분쇄 후 분쇄차엽 250g을 측량하여 유리재질의 병 (4 L용량)에 옮겨 넣었다. 50°C로 가열한 Hexane 1.5 L를 시료에 첨가한 후, 항온 수조 50°C에 30분 정지한 후 상등액을 회수 하였다. 2차로 같은 용매 1.5 L를 넣고 동일한 방법으로 추출하였고, 3차로는 1 L를 넣어 차엽으로부터 성분을 추출하였다. 추출한 핵산은 모두 한곳으로 합하여 필터한 후 감압농축하였다.

또한, 건조 차엽을 믹서기에 분쇄 후 분쇄차엽 1 kg을 측량하여 삼각플라스틱에 옮겨 넣었다. 추출조건은 50°C 추출용매로 식용유를 사용하여 1시간 30분 동안 지용성 성분을 추출하였다. 녹차의 지용성 물질을 추출하기 위하여 초입계 추출법, 용매추출법 등 다양한 지용성 물질 추출방법을 이용하여 수율과 경제성을 확인하였다.

2차년도에는 세포실험을 통하여 체내 간에서의 중성지방 감소 및 콜레스테롤 감소 효과를 확인하였으며, 특히 간세포에서 녹차 지용물 추출물에 의한 FFA에 의한 triglyceride 함량 저해 작용을 측정하였다. 실험 결과 간세포에 palmitic acid를 처리하였을 때 triglyceride 함량은 증가하는 것으로 관찰되었다. 이러한 palmitic acid에 의한 triglyceride 함량증가 작용은 녹차 지용성 추출물 1/10⁸ 이상에서 차단되는 것으로 관찰되었다. 또한, 녹차 지용성 추출물이 FFA에 의한 지방 축적을 차단하는지를 Oil Red Staining을 실시하였다. 실험 결과 간세포에 palmitic acid를 처리하였을 때 Oil Red staining시 지방의 함량이 현저하게 증가하는 것으로 관찰되었다. 이러한 palmitic acid에 의한 지방 축적의 증가 작용은 녹차 지용성 추출물 1/10⁸ 이상에서 차단되는 것으로 관찰되었다.

3차년도에 지용성 녹차 추출물을 이용한 케토제닉 유지 (Lard 등) 대체 원료 개발을 실시하였으며, 케토제닉을 위한 Lard 대체 물질 개발에 대한 연구를 진행하였다. Lard는 주로 포화지방산이 41% 정도이며 1가 불포화지방산이 약 47%이며, 다가 불포화지방산이 12% 정도를 차지하고 있다. Lard 조성과 유사한 조성비를 위하여 다양한 식물성 유지를 블렌딩하여 실험한 결과, 올리브유 50% : 팜유 50%를 혼합하여 Lard와 비슷한 지방조성을 제조하였다.

본 연구는 녹차의 갈산 함량이 증대된 녹차 농축액 추출물의 제조를 위한 실험으로, 녹차 농축액 제조 방법을 새롭게 개발하여 제조된 녹차 추출물은 항비만 및 미백 효과가 우수한 갈산 (gallic acid)을 0.05 내지 0.5 mg/ml 함량으로 포함함으로써, 항비만용 식품 조성물 및 피부 미백용 화장품 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다. 녹차의 갈산의 효능은 다양하다. 항산화 작용, 항박테리아, 항바이러스, 항염, 항알레르기 및 암세포에 대한 항암 활성 등이

있는 것으로 알려져 있다. 특히 갈산은 체지방 감소, 혈중 콜레스테롤 개선 및 피부 미백 효과가 우수하다고 알려져 있다. 갈산은 지방이 소화되는 과정에서 적절히 작용한다. 음식으로 지방을 섭취하면 이자 지질분해효소가 분비되면서 지방이 지방산과 모노글리세리드(MG)로 분해된다. 그리고 소장내 세포 속으로 들어가 중성지방으로 합성된 뒤 혈관을 타고 이동한다. 혈관에서는 지단백질지방분해효소(LPL)에 의해 다시 지방산으로 분해되고 지방세포에 흡수돼 다시 중성지방으로 바뀐다. 에너지로 사용되지 않은 중성지방은 지방 조직에 축적된다. 섭취한 지방이 체내에 쌓이는 과정이다. 갈산은 이자지질분해효소 활성을 억제한다. 지방이 몸에 흡수되기 좋은 상태로 분해되는 것을 줄이는 효과와 같다. 지방이 흡수되지 않고 배출되도록 돕는다. 갈산은 담즙산과도 결합해 담즙산이 지방의 소화작용을 돕고 난 뒤 간으로 재흡수 되는 것을 막는다. 재흡수가 억제되면 몸이 체내 콜레스테롤을 사용하면서 콜레스테롤 농도가 감소한다. 보이차가 혈중 콜레스테롤 개선에 도움이 된다고 하는 이유이다. 이러한 다양한 효능이 있는 갈산은 주로 차 종류에 함유되어 있으며, 특히 보이차에 많이 함유되어 있다고 알려져 있다. 그러나, 보이차는 가격이 비싸 소비자들이 쉽게 접하기 어려운 문제가 있다. 또한, 보이차의 효과를 제대로 보려면 일정량을 매일 마셔야 하며, 건강에 도움이 되려면 하루에 갈산 35mg을 섭취해야 한다. 이는 연구를 통해 도출된 유효 섭취량이다. 일반적으로 보이차 한 잔에 갈산이 약 1.06mg 들어 있다는 점을 고려하면 하루에 33잔을 마셔야 한다.

본 연구에서는 보이차에 비해 상대적으로 가격이 저렴한 녹차를 이용하여 갈산 함량이 증대된 추출물을 제조하기 위하여 연구하여 왔으며, 녹차를 저급알코올로 추출한 추출물을 산 처리하는 경우 녹차 추출물에 포함되어 있던 EGCG 및 ECG 등의 카테킨이 갈산으로 전환되어, 갈산 함량이 현저히 증대된 녹차 추출물을 제조할 수 있음을 확인하였다.

3. 제2 협동연구기관

본 연구는 전남 보성 특화자원인 찻잎을 이용하여 산학연 융합의 집중적인 상품화 연구개발을 통하여 기능성과 기호성이 확보된 고품질의 녹차 상품을 개발하여 제품화 및 사업화하고자 1차년도에는 블렌딩 베이스녹차 기준설정을 위한 보성산 녹차 품질평가로 시기별 블렌딩용 베이스차 봄녹차, 여름녹차, 가을녹차의 성분 총질소, 총아미노산, 탄닌, 카페인을 분석한 결과, 품질기준은 총질소 함량(%)으로 봄녹차는 5.00 ± 0.25 , 여름녹차 4.50 ± 0.25 , 가을녹차 4.00 ± 0.25 로 설정하였으며, 차 전문가집단에 의한 관능평가에서 봄녹차 91.32 ± 3.33 , 여름녹차 89.92 ± 2.71 , 가을녹차 77.99 ± 7.37 의 총점을 나타냈다. 베이스녹차의 기호도 향상을 위해서 티와티 블렌딩시 여름차:가을차 50:50, 또는 여름차:가을차 75:25로 블렌딩하였을 때 기호도가 82점 이상이였다.

2차년도에는 시기별 베이스차 원료 표준화를 위한 대량생산(10kg) 제조공정 확립 및 원료표준화를 위해 수확시기별, 블렌딩비율별 및 제다공정별 베이스녹차 20종에 대해 총질소 함량에 의한 품질기준에서 총질소 4.5 ± 0.25 이상이었으며, G값(녹색도)은 50이상일 때 품질이 우수한데 차의 제조공정에서 증제차가 뒤음차보다 G값이 전체적으로 모두 높았다. 수확시기별, 블렌딩비율별 및 제다공정별 베이스녹차 20종을 한국차품질기준설정위원회의 품질평가 항목의 찻물 색, 향, 맛 전체적인 기호도를 평가한 결과, 봄차와 가을차 50:50으로 혼합 블렌딩한 증제차가 75.4로 가장 높은 점수를 받았으며, 시기별로는 봄차 증제차가 71.9로 가장 높은 평가를 얻었으므로 기능성 및 기호성 블렌딩녹차 제조를 위해서 베이스녹차 선정은 향산화성과 면역력증진 기능성 블렌딩녹차 제품화를 위해서 봄차:가을차 50:50의 블렌딩녹차를 설정하였고, 기억력개선을

위한 기능성 블렌딩차 제품화를 위해서는 봄차 100 를 설정하였다. 기능성 및 기호성 블렌딩녹차 부재료 소재 스크린 및 선발에서 기억력개선 블렌딩녹차 제품화를 위해 베이스녹차로 봄녹차, 은행잎, 비파잎, 구기자, 목련꽃을 선발하였고 블렌딩하였다. 면역력증진을 위한 블렌딩녹차 제품화를 위해 베이스녹차 봄차:가을차(50:50)을, 민들레, 표고버섯, 우엉, 생강, 유자를 선발하고 블렌딩하였다. 항산화 기능성을 위한 블렌딩녹차 제품화를 위해 베이스녹차로 봄차:가을차(50:50)와, 대나무잎, 레몬그라스, 페퍼민트, 감국을 선발하였고 블렌딩하였다. 각각 베이스녹차를 증제차와 덩음차로 나누어서 기능성별로 총 6종의 블렌딩녹차를 혼합제조하고 티백포장하였다. 항산화성과 기억력 개선 효능으로 아세틸콜린에스테라이스 저해능을 평가한 결과 베이스녹차 제조방법별로 증제차 보다는 덩음차에서 더 높은 기능성을 나타냈다. 차전문가 집단의 기능성별 블렌딩녹차의 관능평가 결과는 덩음차보다 외형, 찻물색, 향, 맛, 우려낸잎 전체적인 기호도 모두에서 증제차가 더 높은 기호도를 나타냈다.

블렌딩 베이스녹차 관능적 묘사분석 및 소비자 기호도 조사 주성분 분석은 시료 간, 그리고 특성과의 관계를 상대적으로 나타내어주는 도식으로, 전반적으로 향미의 강도가 높은 시료는 1사분면과 4사분면, 즉 PCA의 우측에 위치하고 있고 쓴맛이 상대적으로 낮고 조화로우미 클수록 1사분면에, 쓴맛이 강한 시료는 4사분면에 위치하고 있는 것을 볼 수 있지만, 강도의 범위는 전반적인 향미강도의 최저값이 4.5정도, 최고값이 6.0 정도이고, 쓴맛 강도의 최저값은 4.0, 최고값은 7.0으로 차이가 그리 크지 않음을 알 수 있었다. 차의 관능적 묘사분석 값과 기기분석의 함량 값에 대한 상관관계의 상관계수가 0.5 이상이 유의적인 상관관계가 있는 것은 NIR로 분석한 총질소 함량과, 환원당, 녹색도 값이 전반적인 향미강도와 조화로운 맛에 정의 상관관계($r=0.527$)를 나타냈으며, 탄닌, ECG, caffein에 대해서는 음의 상관관계를 나타냈다.

3년차에는 기능성별 및 소비자 선호 블렌딩차 레시피 원료배합비 구명에서 항산화성 블렌딩녹차 제품화를 위해 베이스녹차 70%, 대나무잎 10, 레몬그라스 10, 페퍼민트 5, 감국 5 배합비율에서 가장 기호도가 높았으며, 항산화성도 가장 높게 나타났다. 기억력개선 기능성 블렌딩녹차 제품화를 위해서 베이스녹차 50%, 은행잎 20, 비파잎 15, 목련꽃잎 5, 구기자 5, 페퍼민트 5의 재료배합비가 가장 기호도가 높았다. 면역력증진 기능성 블렌딩녹차 제품화를 위해 베이스녹차 70%, 표고버섯 10, 유자 15, 생강 5가 가장 기호도가 높았으며, 항산화성도 가장 높게 나타났다. 신개념 포장기술 적용한 블렌딩녹차 티백, 티업, 캡슐 포장적용과 각 기능성별 블렌딩녹차 제품명으로, 항산화성차는 동안이도다, 기억력개선차는 총명하도다차로, 면역력증진차는 튼튼하도다차로 작명하고 시제품 3종을 제조하였다. 소비자 및 카페업체 소비자대상으로 시제품에 대한 제품 선호도 조사에서는 티백 제품을 가장 선호하였다.

4. 제3 협동연구기관

녹차 지용성물질을 이용한 기능성 식품 개발 및 제품 사업화를 위하여 초임계 추출을 이용한 녹차 유래 기능성 원료의 검증, 보성산 녹차 이용 기능성 및 편이성이 개선된 신개념 블렌딩차 제품 3종 개발, 녹차 유래 폴리코사놀(옥타코사놀) 함유 기능성 식품 제품화 진행, 제형 개발 2종 이상 및 제품화 3건 이상 등을 개발하였다. 이후 녹차 폴리코사놀 제품 표준화 및 원료 등록 신청 및 건강기능성식품 원료 등록 추진하였다.

<본문목차>

< 목 차 >

1장. 연구개발과제의 개요	11
2장. 연구수행 내용 및 결과	14
3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	174
4장. 연구결과의 활용 계획 등	178
붙임. 참고 문헌	182

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1장. 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발 목적

1. 주관기관 :

- 녹차 지용성 물질의 최적 추출공정 확립 및 화장품 원료 최적화
- 녹차의 지용성물질로부터 폴리코사놀 성분분석
- 화장품제형의 항산화시험, 피부개선시험
- 인체적용시험을 실시하여 녹차폴리코사놀성분의 화장소재 개발

2. 제 1협동연구과제 :

- 녹차 지용성 물질의 최적 추출공정 확립 : 초임계이산화탄소추출법에 의한 녹차 지용성 물질의 최적 추출공정 확립
- 대형 초임계추출을 통한 녹차잎으로부터 지용성 물질 추출방법 최적화
- 녹차 초임계 추출물 중 흡착제를 이용한 벤조피렌 제거기술 개발
- 기능성식품 소재로서의 옥타코사놀의 대량생산 기술 개발 (수율 분석)

3. 제 2협동연구과제 : 블렌딩녹차 대량생산 제조공정 및 소비자 선호 블렌딩차 레시피 개발

블렌딩녹차 대량생산을 위한 차베이스 기준설정으로 균일화된 고품질 블렌딩녹차 제조를 위한 제다공정 정립으로 보성산 봄차, 여름차, 가을차를 이용한 소비자가 선호하는 기호성 및 기능성 블렌딩차 레시피 개발 및 상품화로 차 재배 농가의 소득증대에 기여코자 본 과제를 수행하였음.

4. 제 3협동연구과제 :

- 녹차 지용성물질을 이용한 기능성 식품 개발 및 제품 사업화
- 초임계 추출을 이용한 녹차 유래 기능성 원료의 검증
- 보성산 녹차 이용 기능성 및 편이성이 개선된 신개념 블렌딩차 제품 3종 개발
- 녹차 유래 폴리코사놀(옥타코사놀) 함유 기능성 식품 제품화 진행
- 재형 개발 2종 이상
- 제품화 3건 이상
- 농축 녹차 음료 제품 개발 및 시제품 3종 제조
- 녹차 폴리코사놀 제품 표준화 및 원료 등록 신청
- 건강기능성식품 원료 등록 추진

2절. 연구개발의 필요성

1. 주관기관 :

녹차로부터 천연화장품소재개발을 통한 녹차산업발전에 기여하고자 녹차폴리코사놀성분이 함유된 기능성화장품소재를 개발하여 부가가치를 높이고자 한다.

2. 제 1협동연구과제 :

남부대학교 산학협력단은 지난 8년동안 녹차의 지용성 성분에 대한 연구를 지속하면서 상용화 기술 개발에 노하우를 보유하고 있으며, 특히 초고압 시스템과 초임계 유체추출법을 이용하여 녹차잎으로부터 지용성 물질을 다량 추출하였으며, 이들 잎에 존재하는 지용성 물질의 성분 분석 결과, 세계적으로 아직까지 발표되지 않았던 물질인 폴리코사놀과 스쿠알렌이 다량 존재하는 사실을 확인하였다.

따라서, 녹차의 새로운 가치와 하이테크닉 접목한 보성녹차라는 브랜드 가치를 내세워 녹차+폴리코사놀의 강점을 효과적으로 홍보할 수 있을 것으로 생각되며, 이를 위해서는 녹차 유래 폴리코사놀의 인체를 대상으로 기능성을 규명할 필요성이 크게 대두되고 있음.

현재 본 연구팀에서는 이를 위해 산학연 협동으로 녹차소재를 이용하여 체계적인 연구활동을 진행하고자 계획에 착수하였으며, 본 사업을 통하여 시술사업화를 통한 제품 개발 및 건강 기능성 식품으로의 발전을 도모하고자 한다.

3. 제 2협동연구과제 : 블렌딩녹차 대량생산 제조공정 및 소비자 선호 블렌딩차 레시피 개발

젊은 소비자들이 만족한 차로 기호성 및 기능성이 우수한 다양한 차 제품의 요구에 부응한 연구개발로 블렌딩(혼합)에 대한 시도가 필요함.

국내 녹차 소비시장 활성화를 위해 최근 다양한 농특산물(허브, 꽃, 과일)을 혼합한 블렌딩차 제품이 다양하게 요구되며, 맛과 향기가 조화롭게 향상된 고품질의 좋은 차 제품이 개발되고 있음. 세계적으로 유명한 홍차 생산지역인 인도, 스리랑카, 중국 등에서 혼합용 홍차 제품이 수입되어 유통 판매되고 있어 수입 대체 국내산 차 제품의 원료화가 필요함. 수입 유통되고 있는 블렌딩 녹·홍차 제품들 대부분이 허브나 꽃으로 블렌딩되어 있으나 국내 생산 녹차, 홍차는 스트레이트 티로 응용되고 있고, 최근 블렌딩티 제품 생산의 도입을 넘어 산업화 초기 단계로, 산업화를 위한 대량생산 공정기술과 원료 확보 등 블렌딩 녹차 제조에 필요한 다양한 소재 제조 및 블렌딩차 제조기술이 미비한 실정으로 국산 전남 유기농 보성산 녹차를 베이스로하여 품질 고품화 및 기호성 및 기능성이 향상된 다양한 블렌딩 차 제품 개발로 차 소비 확대가 필요함.

보성지역에는 보성녹차생산자조합, 대한다업, 보성제다, 운림다원, 신옥로, 다도락, 보성농협, 녹차 마을영농조합법인, 차산업연구소 등 10여 개의 대량생산 가능한 기계 자동화 제다시설을 보유하고 있는데, 이들 보성 녹차를 베이스차로 한 기호성 및 기능성을 부여한 다양한 블렌딩차 개발 후 상품화가 요구되었음.

봄, 여름, 가을차 시기별 품질 차이가 커, 적정하게 베이스차를 블렌딩하여 품질 균일화하는 기술과 고품질화 연구개발로 블렌딩차 대량생산을 위한 제조공정 정립이 필요함. 과일류, 꽃류, 허브류 이용 블렌딩 차용 소재 선별 및 품질평가와 향후 산업화를 위한 차와 차, 차와 향신료, 차와 허브 등의 기능성 향상 블렌딩 재료 선별 그리고 적정 혼합비율 구명으로 레시피 개발이 요구되었음

4. 제 3협동연구과제 :

3절. 연구개발 범위

1. 주관기관 :

- 녹차 지용성 물질의 최적 추출공정 확립 및 화장품 원료 최적화
- 녹차의 지용성물질로부터 폴리코사놀 성분분석
- 항산화시험, 피부개선시험
- 제형개발
- 인체적용시험을 실시하여 녹차폴리코사놀성분의 화장소재 개발

2. 제 1협동연구과제 :

- 녹차 지용성 물질의 최적 추출공정 확립 : 초임계이산화탄소추출법에 의한 녹차 지용성 물질의 최적 추출공정 확립
- 대형 초임계추출을 통한 녹차잎으로부터 지용성 물질 추출방법 개발 및 최적화
- 녹차 초임계 추출물 중 흡착제를 이용한 벤조피렌 제거기술 개발 및 상용화
- 기능성식품 소재로서의 옥타코사놀의 대량생산 기술 개발 (수율 분석)
- 3협동기관의 제품 개발의 데이터 보완 및 제품 자문

3. 제 2협동연구과제 : 블렌딩녹차 대량생산 제조공정 및 소비자 선호 블렌딩차 레시피 개발

보성지역에는 보성녹차생산자조합, 대한다업, 보성제다, 윤림다원, 신옥로, 다도락, 보성농협, 녹차 마을영농조합법인, 차산업연구소 등 10여 개의 대량생산 가능한 기계 자동화 제다시설을 보유하고 있는데, 이들 보성산 녹차를 베이스차로 한 기호성 및 기능성을 부여한 다양한 블렌딩차 상품화로 차 소비 촉진에 대한 연구개발이 요구되었다.

1년차 : 블렌딩녹차 제조 베이스차 기준설정을 목표로 블렌딩차의 베이스녹차 기준설정을 위해 시중 국내외 블렌딩차의 품질을 평가하여 기준을 설정하였다.

2년차 : 블렌딩녹차 대량생산 제조공정 정립 및 원료 표준화를 목표로 시기별 베이스차 대량생산 (10kg) 제조공정 구명과 기능성 및 기호성 블렌딩녹차 소재 스크린 및 부재료를 선별하였다.

3년차 : 블렌딩녹차 레시피 개발 및 시제품 제조를 목표로 젊은 소비자가 차에 기대하는 항산화성, 기억력개선, 면역력증진 기능성별 원료배합비 구명과 신개념 포장기술 티백, 티업, 캡슐 포장방법을 적용하여 블렌딩차 3종의 시제품을 제조하였다.

4. 제 3협동연구과제 :

- 녹차 지용성물질을 이용한 기능성 식품 개발 및 제품 사업화 2건이상 추진
- 초임계 추출을 이용한 녹차 유래 기능성 원료의 검증
- 보성산 녹차 이용 기능성 및 편이성이 개선된 신개념 블렌딩차 제품 개발
- 녹차 유래 폴리코사놀(옥타코사놀) 함유 기능성 식품 제품화 진행
- 제형 개발 2종 이상
- 제품화 3건 이상
- 농축 녹차 음료 제품 개발 및 시제품 제조
- 녹차 폴리코사놀 제품 표준화 및 원료 등록 신청
- 건강기능성식품 원료 등록 추진 (2021년 완료 목표)

2장. 연구수행 내용 및 결과

1절. 주관기관 : 제너럴네이처(주)

1. 연구개발 추진전략 및 방법

가. 연구개발 추진전략

녹차의 지용성물질로부터 폴리코사놀 성분분석 및 화장품제형의 항산화시험, 피부개선시험을 비롯하여 인체적용시험을 실시하여 녹차폴리코사놀성분의 화장소재를 개발

나. 연구개발 방법

1).

1. 분석 시료

1.1. 시료 구분

시료명	녹차 초임계 추출물
코드명	GTE (Green tea supercritical fluid extract)



녹차초임계추출물

2. 시험물질의 조제

시험물질은 실험에 사용하기전 10% DMSO (Dimethyl sulfoxide)로 희석한 다음, 0.22 μm syringe filter로 여과하여 실험에 사용하였다. 각 시료의 농도별 희석은 PBS로 하였으며 제조된 시료는 냉장 보관하였다.

3. Policosanol 성분 분석

공시료인 녹차 초임계 추출물은 policosanol 성분 분석을 위해 한국품질시험원에 의뢰하여 hexacosanol, heptacosanol, octacosanol, tricosanol을 GC/MS 정량분석하였다. 분석 방법은 hexacosanol, heptacosanol, octacosanol, tricosanol 각각 6.0 mg을 정확히 취하여 한 개의 10 ml 용량 플라스크에 모두 넣어 폴리코사놀 표준품 혼합액을 만들고 증류수로 10 ml 표선에 맞추어 정용하였다. 또한 내부표준물질로서 eicosanol 6.0 mg을 정확히 취하여 별도의 10 ml 용량 플라스크에 넣고 증류수로 10 ml 표선에 맞추어 정용하였다. 이 후 폴리코사놀 표준품의 혼합 수용액으로부터 각각 10 μl , 20 μl , 50 μl , 100 μl 을 취하여 각각의 바이얼에 담고 내부표준용액(internal standard, ISTD) 용액 20 μl 와 N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) 100 μl 를 각각의 바이얼에 넣어 각 바이얼의 용액이 600 μl 가 되도록 클로로포름을 넣었다. 즉 순서대로 470 μl , 460 μl , 430 μl , 380 μl 의 클로로포름을 보충해서 넣고 80 $^{\circ}\text{C}$ 오븐에서 40분간 반응시켜 sily 유도체를 만들고 방냉한 후 GC-MS로 다음 조건 하에 SIM mode에서 분석하였다.

Items	Condition
Instrument	GC: HP 5890(Agilent Inc., Santa Clara, CA, USA) MS: HP 5973(Agilent Inc., Santa Clara, CA, USA)
Column	DB-1MS, fused silica capillary column 30 m (length), 0.32 mm (i. d), 0.25 μ m (film thick.) 0.25 μ m (film thickness)
Transfer temp.	250°C
Injector temp.	320°C
Flow rate	Helium 5 mL/min
Column temp.	Programmed from 230 to 305°C, 3°C/min 305 to 320°C, 20°C/min
MS quad. temp.	150°C
MS source temp.	230°C
Ionization	EI (70 eV)

4. 항산화 시험

4.1. DPPH free radical scavenging activity

DPPH (1,1-diphenyl-2-picryldrazyl) 라디칼 제거 활성은 Hsu 등(2006)의 방법에 따라 측정하였다. 공시료는 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 사용하여 농도별로 희석하였으며, 시료 40 μ l와 300 mM DPPH 760 μ l을 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨후 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4.2. Hydroxyl radical scavenging activity

Hydroxyl radical 제거 활성은 Smirnoff와 Cumbes (1989)의 방법에 준하여

수행하였다. 250 μ l의 FeSO_4 , 175 μ l의 H_2O_2 를 75 μ l의 농도별 공시료와 잘 혼합하여 37 $^\circ\text{C}$ 에서 30분간 반응시킨 후, 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4.3. Fe^{2+} -chelating assay

Fe^{2+} -chelating 활성 분석은 Hsu 등 (2006)의 방법을 수정하여 실행하였다. 2 mM FeCl_2 15 μ l와 시료 150 μ l, 5 mM ferrozine 30 μ l, 605 μ l의 증류수를 혼합하여 상온에서 15분간 반응시킨 후 Infinite 200pro (Tecan, PerkinElmer, USA)을 이용하여 562 nm에서 Fe^{2+} -ferrozine 혼합 용액의 흡광도를 측정하였다.

4.4. ABTS assay

시료의 라디칼 소거능 측정은 ABTS antioxidant assay 방법으로 측정하였다. 7 mM 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (Sigma, A1888) 와 2.45 mM potassium persulfate를 1:1로 혼합하여 16 시간 동안 반응시켜 ABTS^+ 을 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도 0.7 값이 나오도록 증류수로 희석하여 사용하였다. 희석된 ABTS^+ 용액 190 μ l 와 시료 10 μ l를 혼합하여 15분후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4.5. 항산화활성 계산 산출 방법

각 실험 항목에서 농도에 따른 공시료의 항산화 활성은 다음의 식으로 %를 계산하였다.

$$\text{소거능(\%)} = \{1 - (\text{공시료 첨가군의 흡광도} / \text{공시료 무첨가군의 흡광도})\} \times 100$$

5. 피부 개선 시험

5.1. 시험 세포주

실험에 사용한 B16F1 (악성흑색종 세포)은 Korean Cell Line Bank (KCLB)로부터 분양 받아 사용하였으며, 세포 배양에 필요한 시약은 Gibco (USA)에서 구입하였다. 세포 배양 배지는 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin을 함유한 DMEM 배지에서 37°C와 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다.

5.2. 세포 독성 분석

시료 처리에 의한 농도 의존적 세포생존율은 WST-1 assay로 측정되었다. 배양된 세포를 96 well plate에 2×10⁴ cells/well이 되도록 분주하였다. 24시간 배양 후 시료를 농도별로 처리하고 24, 48시간을 배양한 후 WST-1 시약을 100 µl당 10 µl씩 첨가하여 반응시킨 뒤 microplate reader (Infinite 200, Tecan Trading AG, Switzerland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 다음과 같은 공식을 이용하여 산출하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = (\text{시료 처리군의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도}) \times 100$$

5.3. Melanin 농도 측정

Melanin 성분의 측정은 Hosoi 등(1985)의 방법을 응용하여 실험하였다. B16F1 세포를 24 well plate에 2×10^5 cells/well이 되도록 분주하여 24시간 후 농도별 시료를 처리하여 48시간 배양하였다. 배양이 끝난 세포는 배지를 제거한 다음 10% DMSO가 포함된 1 N NaOH 용액을 처리하여 65°C에서 2시간동안 용해시킨 뒤 Microplate reader를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

5.4. Elastase 억제능 분석

Porcine pancreas elastase 저해 활성 측정은 기질로서 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide를 사용하여 37 °C에서 30분간 p-nitroanilide의 생성량을 측정하였다(Cannell et al., 1988). 즉, 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 0.1 ml씩 시험관에 취하고 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 elastase, pancreatic solution, Type I : From Porcine Pancreas (0.6 units/ml)용액 0.05 ml을 가한 후 기질로 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide (1 mg/ml)을 0.1 ml 첨가하여 30분간 반응시켜 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

5.5. Tyrosinase 억제능 분석

Tyrosinase 활성도는 Yagi 등(1986)의 방법에 의하여 측정하였다. 시험관에 pH 6.8의 1.15M sodium phosphate buffer 0.5 ml에 10 mM L-DOPA을 녹인 기질액 0.2 ml 및 시료용액 0.1 ml를 넣은 혼합액에 110 Unit/ml mushroom

tyrosinase 0.2 ml를 첨가함. 이 후 25℃에서 2분간 반응시키고 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 microplate reader를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

6. 통계 분석

각 군 간의 통계적 유의성 검정에 따른 통계분석은 ANOVA(one-way analysis of variance test) Duncan 사후검정 비교를 실시하여 $p < 0.05$ 일 때 유의한 것으로 판정 하였다(SPSS V12., SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

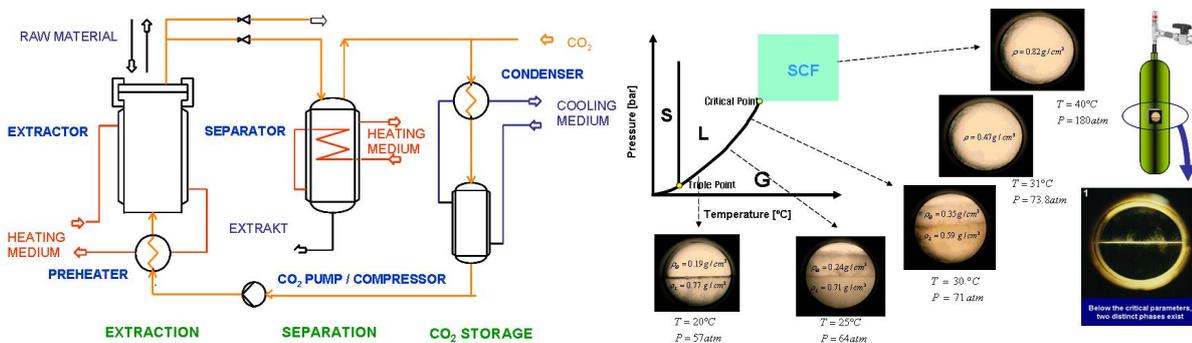
2. 연구 내용 및 결과

2-1. 초임계이산화탄소추출법에 의한 녹차 지용성 물질의 최적 추출공정 확립 및 유화형시작품 제작 (1차년도)

2-1-1. 초임계이산화탄소추출법에 의한 녹차 지용성 물질의 최적 추출공정 확립

가. 초임계 이산화탄소 추출 장치를 이용한 공정단계 확립

- (1단계): 녹차잎을 건조하여 분쇄한 후, 용매와 보조용매를 이용한 초임계추출을 하여 얻은 유지를 유지 전체가 담길 정도의 에탄올에 혼합하여 1~3시간 침지
- (2단계): 상기 1단계 혼합물 부피의 3 ~ 5배에 해당하는 1)에탄올, 수산화칼륨 또는 수산화나트륨, 물이 혼합된 용액을 첨가
- (3단계): 상기 2단계의 혼합 용액을 교반하면서 섭씨 60도의 온도로 90분 동안 가열한 다음, 0도 ~ 20도로 냉각한 후 고급지방산염을 분리
- (4단계): 남은 여액을 원심분리기에 넣어 에탄올을 분리하고 농축건조



<초임계 이산화탄소 유체를 이용한 지용성물질분리 추출법>

나. 초임계이산화탄소추출장치 조건 확립

추출조는 300mL 용량인 고압용 stainless steel을 사용.

초임계 유체 line은 1/4 “와 1/8 “의 stainless steel pipe (316ss)를 사용.

액체 이산화탄소로부터 용매를 초임계 압력으로 변환시키는 고압펌프 (MiltonRoy)는 추출조로 유입되는 이산화탄소의 유량을 정량적으로 pumping 하고 보조용매인 ethanol(99%)을 정량적으로 주입시킬 수 있는 보조용매 pump는 Solvent Delivery Pump (Young-lin scientific Co.,modelNo.:930)를 사용.

고압 상태로 추출조에 들어가고 나오는 초임계 이산화탄소의 온도를 측정하는 digital temperature measuring (Waveteck사 model No.:461-112020) 장치를 이용하여 초임계 유체의 온도를 측정.

추출조의 압력은 초임계유체가 추출조로 들어가는 하단은 digital pressure measuring (Valcom사 model No. : VPRQ-A3-350K-4C) 장치로 초임계 유체가 추출조를 통과하여 나오는 추출조 상단은 Coleparmer gauge로 측정.

System내의 압력은 1개의 back pressure regulator valve로 조절하고 미세한 유량조절은 metering valve로 조절.

다. 온도와 압력에 따른 추출률 정립

압력은 200, 300, 400, 500 bar에서 온도는 30, 40, 50℃로 변화 시키면서 추출량을 분석.

실험에 사용된 초임계 추출장치는 semi-continuous flow extractor로 추출 탑속에 녹차잎 시료 20g을 충전시킨 후 포화 압력상태인 이산화탄소가 실린더로부터 냉각기 (-15℃)를 통과하면서 이산화탄소 내에 잔존하는 기포가 제거된 후 고압펌프에 의해 시스템 내의 설정 압력까지 일정한 유량으로 유입.

고압펌프로부터 추출탑에 유입 되기전에 추출용매로 작용하는 이산화탄소를 설정된 추출 온도에 따라 항온조에 의해 예열되고 추출탑 내의 온도는 열 전지에 의해 감지되어 추출 온도를 결정. 초임계 이산화탄소는 추출 탑내의 시료로부터 목적성분을 추출하여 낮은 압력상태로 분리조 내에 유입되어 용제와 용매가 쉽게 분리되었으며이때이산화탄소는추출공정동안사용된건식가스 유량계에 의해 이산화탄소의 양을 측정한 후 대기로 방출.

주용매인 이산화탄소는 25mL/min의 유량으로 주입하고 보조용매는1.0 mL/min 의 유량으로 주입.

반응시간은 전체 60분 trap의온도를 -15℃로 설정하고 추출된 물질은 ethanol (99%, HPLC grade, Aldrich)로 Rinse.

라. 초임계이산화탄소추출법에 의한 녹차 지용성 물질의 확인

그림 1은 녹차엽 지용성 추출물의 불검화물에 대한 GC-MS분석결과에 대한 total ion chromatogram을 나타낸 것이다.

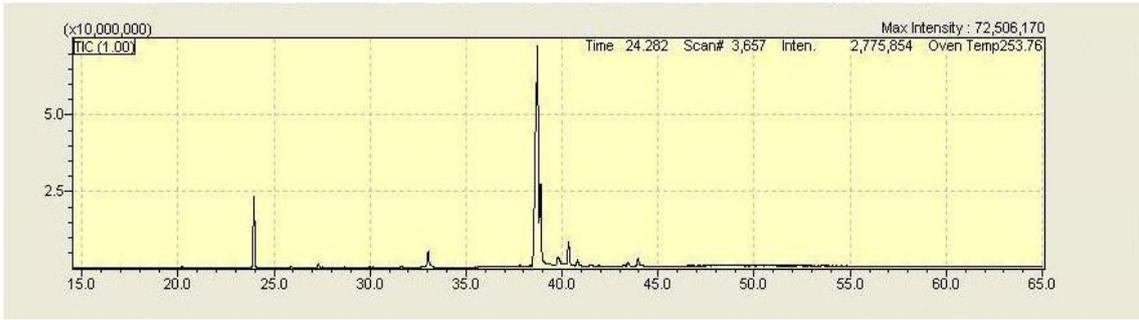


그림 1) 녹차 지용성 추출물의 GC-MS분석

마. 녹차 지용성 추출물의 파이토스테롤 (α -토코페롤, 스쿠알렌 등) 분석

추출한 불검화물들은 TMS화 반응을 시킨 후, TMS화 반응이 끝난 시료를 GC (GC-2010, Simadzu, Japan)에 주입하여 분석하였음. 사용한 컬럼은 Capillary column Rtx®-1 (30m X 0.25mm I.D., film thickness 0.25 μ m, RESTEK International, Belleford, PA, USA)이었음. 주입구 및 검출기 온도는 각각 315°C 및 315°C 이었음. 파이토스테롤 중 특히, 스쿠알렌의 구조확인 은 GC-MS를 이용하여 얻은 mass spectrum을 NISTlibrary에서 얻은 mass spectrum과 비교하여 확인하였고, GC분석에서 표준품과 동일한 R.T.값으로 다시 한번 확인하였음.

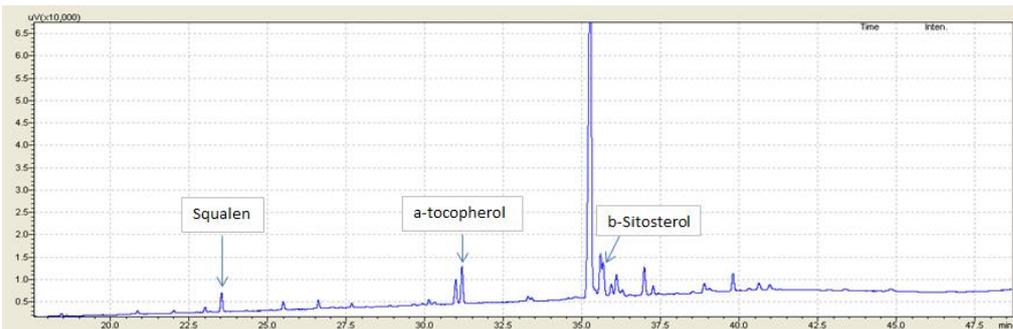


그림 2) 토코페롤 함량 분석

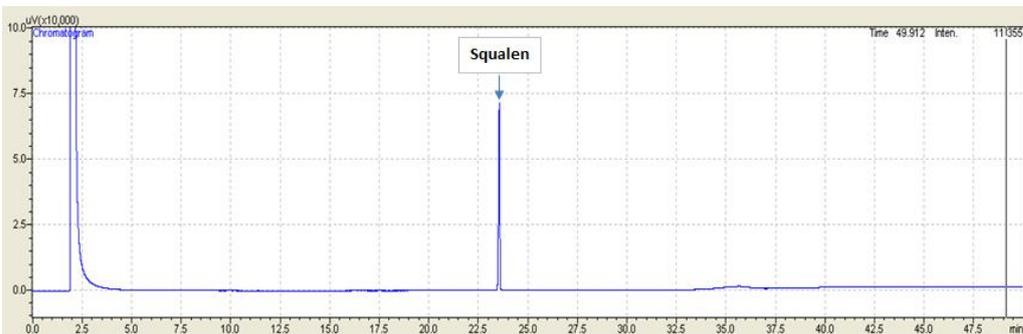


그림 3) 스쿠알렌 동정 분석

바. 녹차 지용성 추출물의 파이토스테롤(α -토코페롤, 스쿠알렌 등)함량 측정

녹차엽으로부터 얻은 지용성추출 성분을 비누화하여 얻은 불검화물을 GC-FID로 분석한 gas chromatogram을 나타낸 것임. 이 분석을 통하여 RT 23분에 기존에 분석한 폴리코사놀이 아닌 다른 성분 (A)이 매우 높은 함량으로 존재하는 것을 발견하였음. 따라서 이 물

질A에 대한 성분 확인을 위하여 GC-MS 분석을 실시하였음. 그림 1는 물질 A의 full scan mass spectrum을 나타낸 것임. 이 mass spectrum은 NIST library상의 스쿠알렌의 mass spectrum과 매우 유사하여 임시적으로 스쿠알렌으로 판단하였음. 성분을 다시한번 확인하기 위하여 표준품인 스쿠알렌을 동일한 조건에서 GC분석을 행한 결과 성분 A와 표준품 스쿠알렌이 동일한 RT를 나타내어 스쿠알렌임을 확인할 수 있었음.

표1. 녹차 지용성 추출물 중의 토코페롤과 스쿠알렌의 함량

	alpha-Tocopherol	Squalene (mg/kg)
8월 채취엽	759.41 ± 17.59	1538.35 ± 10.28
9월 채취엽	1063.21 ± 57.97	1032.97 ± 1.39

2-1-2. 녹차지용성물질을 이용한 기초화장품 유화제형 시작품 제작

가. 연구목적

본 연구는 제너럴네이처(주)의 공정에 따라 제조된 녹차추출물을 제공받아 유화 제형을 적용하여 시작품제작을 실시 검토하여 향후 본 제품 개발의 기초 자료로 삼고자 함이다.

나. 연구기간

2017. 1. 15. ~ 2017. 12. 27

다. 의뢰물질

의뢰사로부터 제공받은 1종의 녹차추출물에 대한 정보는 다음과 같다(Table 1).

Table 1. 원료 정보

의뢰물질	pH	성상	농도	향
녹차추출물 (GN_170901)	6.5	짙은 녹색 현탁액	As is	녹차향

라. 제형 검토 방법

각 제형의 기본 레시피에 녹차추출물을 3가지 농도로 W/O 제형 또는 O/W 제형을 제조하여 점도, pH 등의 이화학적 성상과 색, 향 등의 육안평가를 동시에 검토하였다.

마. 평가



그림 1. 내용물 검토를 위해 투명 용기에 분취함(침전은 확인되지 않았으나 상층의 층분리가 확인됨)

◆ 경시적인 크림 제형(W/O)의 안정성 (사진 / 육안평가)

녹차 추출물 (v/w%)	11.22	11.29	12.6	12.13
x1				
x2				
x3				



◆ 경시적인 유액의 제형(O/W)의 안정성 (사진 / 육안평가)



의뢰사에서 제공된 녹차추출물을 사용하여 O/W제형의 유액을 제조하고 4주 동안 관찰한 결과 색, 향, 점도의 변화는 없었으며, 0.05% (v/v%)에도 크림 제형(W/O)의 각각의 같은 농도에서보다 더 진한 녹차색을 나타내었다.

본격적인 시제품 제작에 앞서 이번 제형 검토를 통해 유효활성성분의 함량 및 원료 제형 그리고 원료 색깔이 제품 적용이 용이하도록 해야 하는 개선점이 도출되었다.

피부도포 후 이상 반응 확인 피부 안정성에 준하는 의뢰사의 녹차추출물이 함유된 시제품을 팔 안쪽에 도포하고 오픈 상태에서 30분간 노출 후 피부의 홍반, 가려움증 등의 반응을 관찰하였다. 피부이상 반응은 관찰되지 않았다.

이번 제작된 시제품은 이후 지속적인 관찰을 통해 시제품 제작의 정보를 제공하도록 활용될 것이다.

바. 결 론

위와 같이 제너럴네이처(주)에서 제공된 녹차추출물(1종)을 사용하여 화장품 제형 (O/W, W/O) 검토를 진행하였으며 다음과 같은 결과를 요약하였다.

1). 색상 : 두가지 시제품제작에서 모두 함량별 x1(0.05%), x2, x3 넣은 3가지 농도를 준비하였다. 녹차의 녹색이 모든 시제품에서 나타났으며 함량이 높아짐에 따라 짙은 녹차색을 나타내었다. 또한 유액의 경우에는 모든 농도에서 균질하지 못한 입자가 관찰되었으며 크림의 경우 x3을 넣어 준 경우에 녹차추출물의 입자가 육안으로 관찰되었다. 향후 녹차추출물의 화장품 원료 기준 규격 제정에 참고하여 개선할 점으로 파악되며 제형 결정에도 참고할 사항으로 사료된다.

2). 제형 안정성 : 시험기간동안 제형 안정성이 유지되었다. (가혹시험은 진행하지 않았음)

3). 향 : 시험기간동안 향이 지속적으로 유지되며 녹차가 함유된 제품의 특징을 잘 나타내었다.

4). 피부이상반응 : 의뢰사의 녹차추출물로 제조된 각 제형의 농도별 시료를 피부에 도포하고 30분 동안 오픈 테스트를 실시한 결과 홍반, 가려움 등의 피부 이상 반응은 관찰되지 않았다.

2-2. 녹차 초임계 추출물의 항산화 및 피부개선 시험 (2차년도)

1. Policosanol 분석



시험성적서 Analysis Research Center

Page : 2/2

성적서번호 : KE-181123-1493
시료번호 : 270
시료명 : 녹차 초임계 추출물

결과

분석영역	단위	결과
Hexacosanol	mg/kg	149.3
Heptacosanol	mg/kg	16.3
Octacosanol	mg/kg	1528
Tricosanol	mg/kg	6.0

NOTE : 1) 분석기기 - GC/MS

이하여백

본 연구의 공시료인 녹차 초임계 추출물의 policosanol의 함량을 확인하기 위해 GC/MS를 이용한 정량분석을 실시하였다. 분석 결과 hexacosanol은 149.3 mg/kg, heptacosanol은 16.3 mg/kg, octacosanol은 1528 mg/kg, tricosanol은 6.0 mg/kg로 확인되었다(그림 1).

2. 항산화 시험

2.1. DPPH free radical scavenging activity

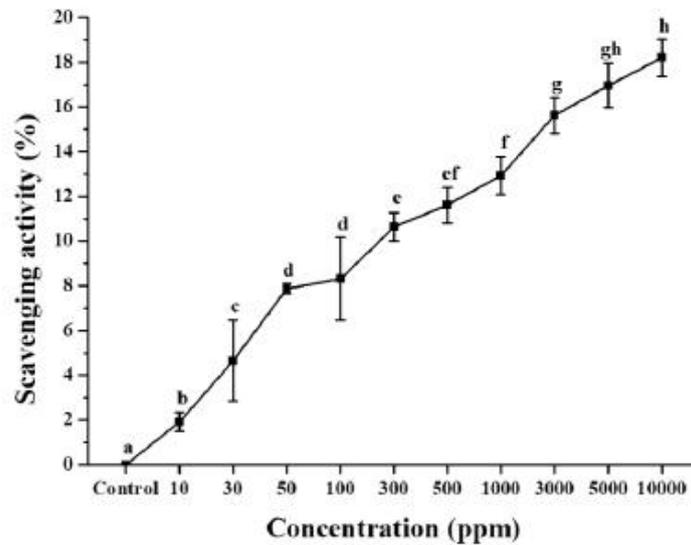


그림 2. 녹차 초임계 추출물의 DPPH free radical 저해활성(%)

^{a~h)} 실험군별 평균값의 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 에 대한 각각의 부집단으로 표기

DPPH는 항산화활성을 측정하는데 가장 대표적인 바이오마커로서, 안정한 free radical인 DPPH가 전자공여체인 항산화제와의 반응으로 인해 변색되는 것을 관찰하여 활성산소 소거에 미치는 영향을 확인할 수 있는 지표인자이다. 녹차 초임계 추출물의 DPPH free radical 제거 활성은 처리농도에 따라 점차 증가하여 10000 ppm 의 농도에서 $18.21 \pm 0.84\%$ 의 항산화 효과를 보였다(그림 2).

2.2. Hydroxyl radical scavenging activity

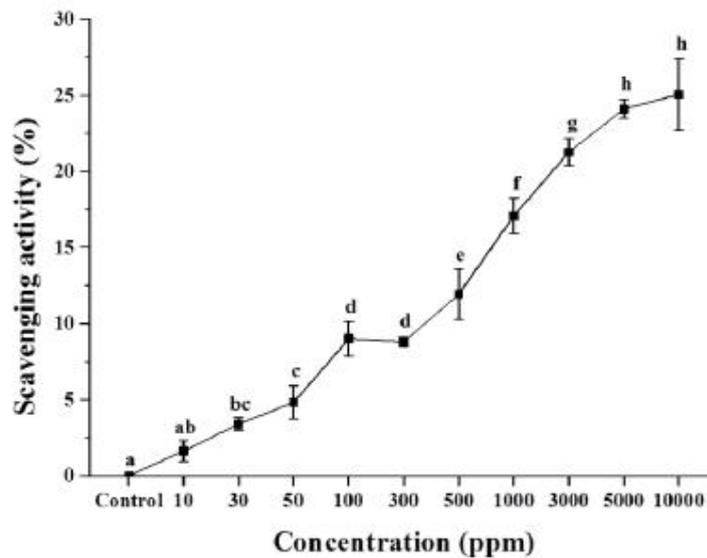


그림 3. 녹차 초임계 추출물의 hydroxyl radical 저해활성(%)

^{a~h)} 실험군별 평균값의 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 에 대한 각각의 부집단으로 표기

Hydroxyl radical은 산화물질 중 가장 독성이 강한 것으로 알려져 있으며 이는 Fe^{2+} 과 과산화수소와의 Fenton 반응에 의해 생성되므로 이를 이용한 항산화활성은 개발하고자 하는 소재가 반응성의 큰 활성산소에 의한 산화적 스트레스를 감소시키는 데 미치는 영향을 확인하는데 중요한 바이오마커로서 의미가 있다. 본 연구에서 녹차 초임계 추출물이 hydroxyl radical의 생성 및 제거에 미치는 영향을 분석한 결과 30 ppm 의 농도에서부터 유의적인 활성을 보이기 시작하여 10000 ppm 의 농도에서 $25.06 \pm 2.34\%$ 의 활성을 보이는 것으로 조사되었다(그림 3).

2.3. Fe²⁺-chelating activity

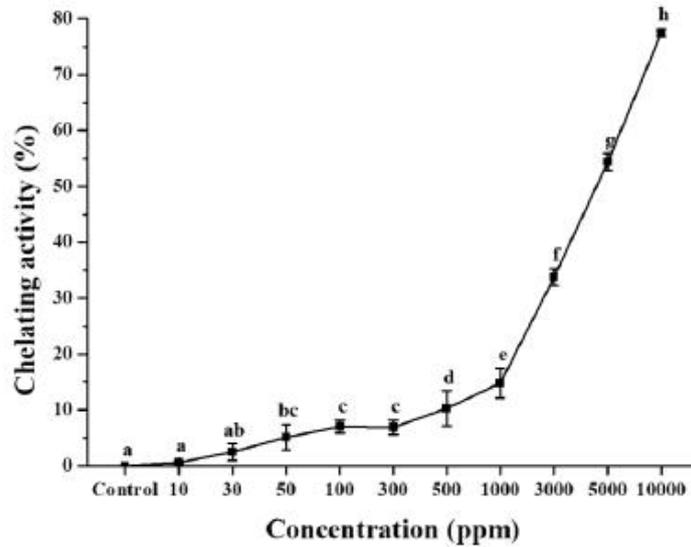


그림 4. 녹차 초임계 추출물의 Fe²⁺-chelating 활성(%)

^{a-h)} 실험군별 평균값의 통계적 유의수준은 p<0.05에 대한 각각의 부집단으로 표기

철은 생체의 성장과 발달에 중요한 미량 무기질 영양소로써 산소 운반 및 에너지 대사에 필수적인 성분이다. 그러나 Fe³⁺는 반응성이 큰 활성산소에 의해 환원되면 과산화수소를 전이시켜 hydroxyl radical을 생성한다. 따라서 Fe²⁺ 이온에 대한 chelating 효과는 Fenton 반응에 의한 유리 라디칼의 생성 억제 여부를 알 수 있다. 본 연구에서 녹차 초임계 추출물의 Fe²⁺-chelating 활성은 농도의존적으로 증가하여 100 ppm에서 7.02±1.14%, 500 ppm에서 10.29±3.12%, 1000 ppm에서 14.83±2.64%, 3000 ppm 에서 33.82±1.52%, 5000 ppm 에서 54.38±1.52%, 10000 ppm에서 77.51±0.62%로 높은 활성을 보이는 것으로 조사되었다(그림 4).

2.4. ABTS scavenging activity

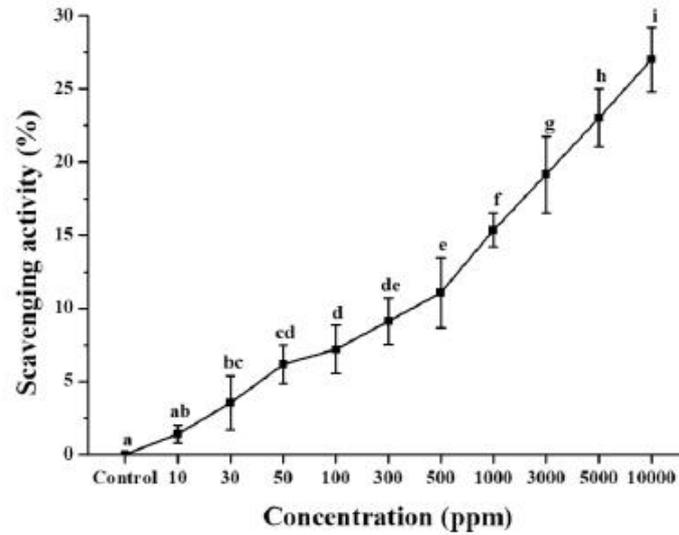


그림 5. 녹차초임계추출물의 ABTS 저해활성(%)

^{a-i)} 실험군별 평균값의 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 에 대한 각각의 부집단으로 표기

ABTS 라디칼 소거활성도 DPPH을 이용한 방법과 함께 항산화활성을 측정하는데 많이 이용되는 방법이다. ABTS는 항산화물질과 반응하여 양이온 라디칼이 소거되면서 청록색에서 무색으로 탈색되는 원리로 항산화활성을 측정하는데 사용된다. 본 연구에서 녹차 초임계 추출물의 ABTS 저해 활성을 분석한 결과 농도가 증가할수록 저해 활성이 증가하기 시작하여 최고 농도인 10000 ppm에서는 $27.02 \pm 2.19\%$ 의 활성을 보이는 것으로 조사되었다(그림 5).

3. 피부 개선 시험

3.1. B16F1 melanoma 세포 생존율 분석

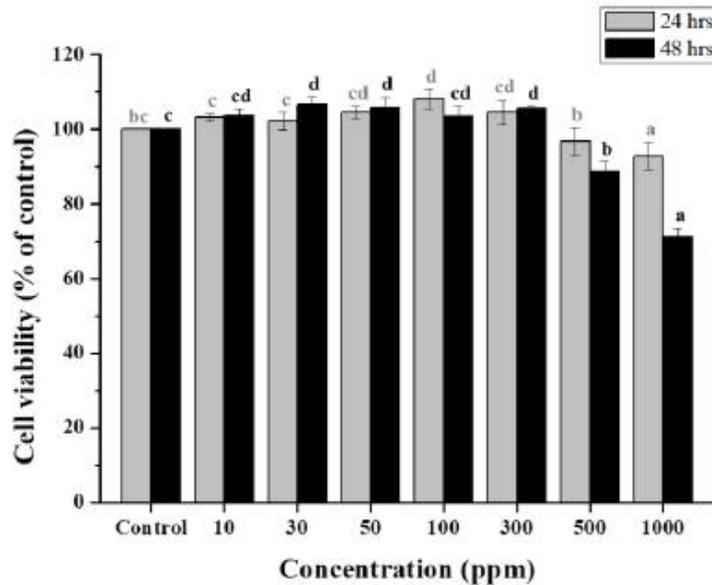


그림 6. 녹차 초임계 추출물이 melanoma 세포의 생존율에 미치는 영향(%)

^{a~d)} 실험군별 평균값의 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 에 대한 각각의 부집단으로 표기

녹차 초임계 추출물의 멜라닌 억제능을 알아보려고 멜라닌을 생성하는 세포인 쥐 흑색종 세포 B16F1 세포를 사용하여 멜라닌 억제 연구를 수행하였다. 이를 위하여 녹차 초임계 추출물의 처리에 따른 B16F1 세포 독성 농도를 확인한 결과 시료 처리 24시간 및 48시간 후 10 ppm~300 ppm의 농도에서는 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않아 세포 독성이 없는 것으로 나타났다(그림 6). 이러한 결과를 바탕으로 녹차 초임계 추출물의 500 ppm 이상의 농도에서 시료 자체의 독성으로 인해 세포 생존율을 감소시키는 것으로 생각되어, 세포에 독성을 미치지 않는 300 ppm의 농도를 공시료의 최고 농도로 설정하여 차후 실험을 진행하였다.

3.2. Melanin 농도 측정

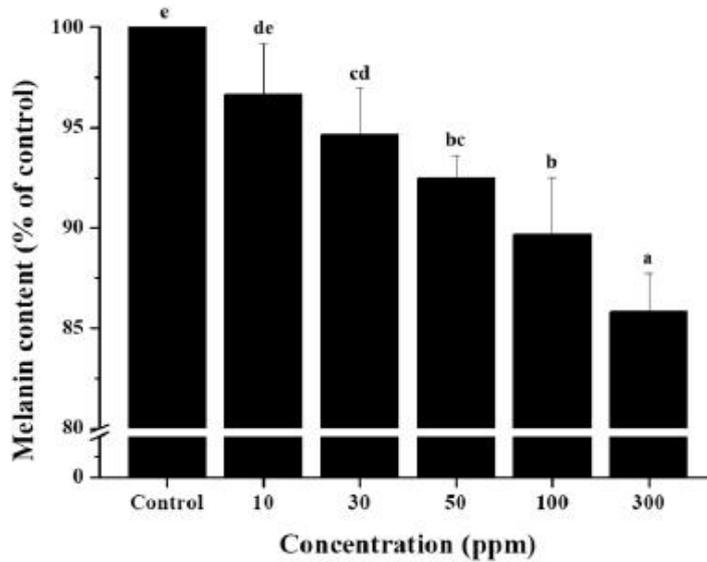


그림 7. 녹차 초임계 추출물이 melanoma 세포의 melanin 생성에 미치는 영향(%)

^{a~e)} 실험군별 평균값의 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 에 대한 각각의 부집단으로 표기

멜라닌은 태양광선으로 들어오는 자외선을 차단하는 역할을 하지만, 국소적으로 과도하게 합성되거나 노화 등에 의해 피부 생리 기능이 떨어질 경우 주근깨, 기미 등 다양한 색소 침착을 유발 한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 녹차 초임계 추출물의 멜라닌 억제능을 알아보기로 하여 흑색종 세포 B16F1 세포에 시료를 농도별로 처리하여 Melanin 생성 저해활성을 측정하였다. 분석 결과 10 ppm에서 $96.6 \pm 2.5\%$, 30 ppm 에서 $94.6 \pm 2.3\%$ 50 ppm 에서 $92.6 \pm 1.1\%$, 100 ppm 에서 $89.7 \pm 2.8\%$, 최고 농도인 300 ppm에서 $85.8 \pm 1.9\%$ 로 나타나 녹차 초임계 추출물의 처리 농도가 높아질수록 멜라닌 농도는 감소하는 경향을 보이거나 유의하게 감소된 것으로 조사되었다(그림 7).

3.3. Elastase 저해 활성

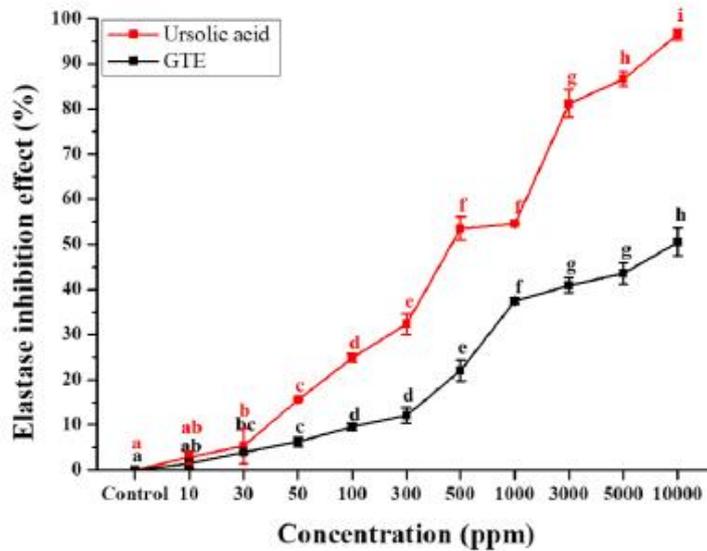


그림 8. 녹차 초임계 추출물의 elastase 저해 활성(%)

a~i) 실험군별 평균값의 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 에 대한 각각의 부집단으로 표기

엘라스틴은 콜라겐과 함께 결합조직에 존재하고 고무탄력성과 같은 신축성이 있는 단백질이며 조직의 유연성, 신축성에 관여한다. Elastin을 분해하는 효소들 중 하나인 elastase는 elastin을 포함하여 collagen과 다른 ECM 단백질을 비특이적으로 분해하는 효소로 주름을 생성하는 직접적인 원인 중 하나이다. Elastase에 의한 주름의 생성은 섬유아세포의 elastin 생성량과 관련되어 있고, elastase의 활성을 억제 혹은 조절하여 주름의 생성을 지연시킬 수 있다. 본 연구에서 녹차 초임계 추출물의 elastase 저해능을 측정한 결과 30 ppm의 농도에서부터 저해능이 점차 증가하기 시작하여 시료의 최고 처리농도인 10000 ppm에서는 $50.5 \pm 3.1\%$ 의 활성을 보이는 것으로 나타났다(그림 8).

3.4. Tyrosinase 저해 활성

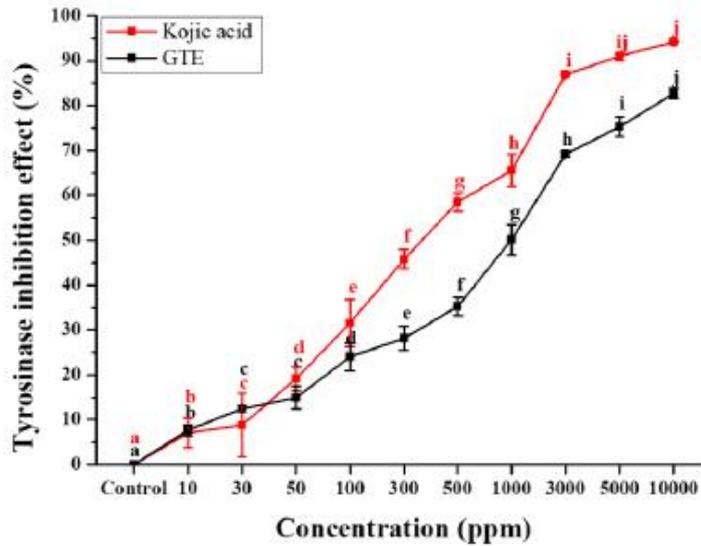


그림 9. 녹차 초임계 추출물의 tyrosinase 저해 활성(%)

a~h) 실험군별 평균값의 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 에 대한 각각의 부집단으로 표기

기저층의 tyrosinase는 아미노산인 tyrosine을 산화시켜 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 만들고 DOPA 또한 DOPA quinone으로 산화시키는 효소이며, 멜라닌 색소의 형성 및 기미와 주근깨의 생성에 관여한다. 본 연구에서 녹차 초임계 추출물의 tyrosinase 저해능을 측정한 결과 10 ppm의 농도에서부터 저해능이 점차 증가하기 시작하여 시료의 최고 처리농도인 10000 ppm의 농도에서는 $82.7 \pm 1.1\%$ 의 활성을 보이는 것으로 나타났다. 이러한 활성은 양성 시료인 kojic acid와 유사한 수준으로 확인되어 본 시료의 녹차 초임계 추출물의 tyrosinase의 활성이 매우 높은 것으로 조사되었다(그림 9).

2-3. 녹차 초임계 추출물의 시제품제작 및 인체적용시험 (3차년도)

2-3-1. 녹차초임계 추출물의 시제품제작

가. 녹차초임계 추출물의 안전성시험

1). 중금속시험

the way to trust **KCL**



2455-1288-6486-2142

시험성적서

COPY 복사본

1. 성적서 번호 : CT19-142598K
2. 의뢰자
 - 업체명 : (주)제너럴네이처
 - 주소 : 전북 순창군 순창읍 민속마을길 61-27, 3층
3. 시험기간 : 2019년 12월 19일 ~ 2019년 12월 30일
4. 시험성적서의 용도 : 참고용
5. 시료명 : 녹차초임계추출물 [제조번호/제조일자/사용기한:GT20190515/2019-05-15/2년]
6. 시험방법
 - (1) 화장품 안전기준 등에 관한 규정 (준용)
7. 시험결과
 - 1) 녹차초임계추출물 [제조번호/제조일자/사용기한:GT20190515/2019-05-15/2년]

시험항목	단위	기준치	시험방법	시험결과	비고	시험장소
납(Pb)	µg/g	-	(1)	불검출 (검출한계 2)	-	A
비소(As)	µg/g	-	(1)	불검출 (검출한계 1)		
수은(Hg)	µg/g	-	(1)	불검출 (검출한계 0.01)		
안티몬(Sb)	µg/g	-	(1)	불검출 (검출한계 2)		
카드뮴(Cd)	µg/g	-	(1)	불검출 (검출한계 1)		

※ 시험장소
A : 서울특별시 금천구 가산디지털1로 199 (가산동)

— 끝 —

확인	작성자명 한소애 	기술책임자명 원철현 
----	---	---

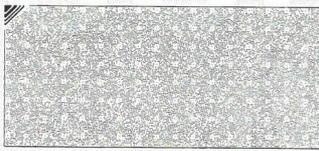
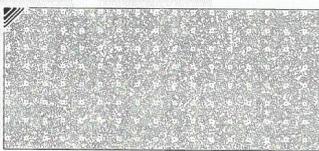
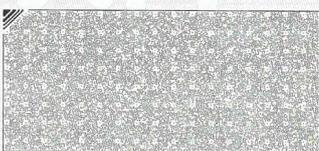
비고 : 1. 이 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인정과 관련이 없으며, 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명에 한정된 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다.
 2. 이 성적서는 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.
 3. 이 성적서의 일부만을 발췌하여 사용한 결과는 보증할 수 없습니다.
 4. 이 성적서의 진위여부는 홈페이지(www.kcl.re.kr)에서 확인 가능합니다.

2019년 12월 30일

한국건설생활환경시험연구원 

결과문의 : 54852 전라북도 전주시 덕진구 여산로 136 (여의동) ☎ (063)711-6007

총 1페이지 중 1페이지 양식TQP-12-01-03(1)

2). 미생물시험

the way to trust **KCL**



3600-9105-6433-3804

시험성적서

COPY 복사본

1. 성적서 번호 : CT19-142597K
2. 의뢰자
 - 업체명 : (주)제너럴네이처
 - 주소 : 전북 순창군 순창읍 민속마을길 61-27, 3층
3. 시험기간 : 2019년 12월 19일 ~ 2019년 12월 30일
4. 시험성적서의 용도 : 참고용
5. 시료명 : 녹차초임계추출물 [제조번호/제조일자/사용기한:GT20190515/2019-05-15/2년]
6. 시험방법
 - (1) 화장품 안전기준 등에 관한 규정 (준용)
7. 시험결과
 - 1) 녹차초임계추출물 [제조번호/제조일자/사용기한:GT20190515/2019-05-15/2년]

시험항목	단위	기준치	시험방법	시험결과	비고	시험장소
대장균	-	불검출	(1)	음성	-	A
녹농균	-	불검출	(1)	음성		
황색포도상구균	-	불검출	(1)	음성		

 - ※ 시험장소
 - A : 서울특별시 금천구 가산디지털1로 199 (가산동)

— 끝 —

확인	작성 자명	한소애		기술책임자 성명	원철현	
----	----------	-----	---	-------------	-----	---

비고 : 1. 이 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인정과 관련이 없으며, 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명에 한정된 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다.
 2. 이 성적서는 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.
 3. 이 성적서의 일부만을 발췌하여 사용한 결과는 보증할 수 없습니다.
 4. 이 성적서의 진위여부는 홈페이지(www.kcl.re.kr)에서 확인 가능합니다.

2019년 12월 30일

한국건설생활환경시험연구원 

COPY 복사본

COPY 복사본

결과문의 : 54852 전라북도 전주시 덕진구 여산로 136 (여의동) ☎ (063)711-6007

총 1페이지 중 1페이지 양식TOP-12-01-03(1)





나. 시작품 제작

1). 시작품의 전성분 및 기능성원료 함량

BIO&CEUTI Co., LTD

Manufacturing Plant : 137, 945-6 Kirindae-ro Deokjin-gu Jeonju-city, Jeollabuk-do,

Tel) +82-507-1415-2423 Fax) +82-507-707-2423

MATERIAL SAFETY DATA SHEET

SECTION 1. SUBSTANCE IDENTIFICATION

PRODUCT : Green Tea Cream

	INCI NAME	WT %	CAS NO.	FUNCTION
1	Water	52.700	7732-18-5	Solvent
2	Butylene Glycol	8.000	107-88-0	Skin Conditioning Agent
3	Cetyl Ethylhexanoate	5.000	59130-69-7	Skin Conditioning Agent-Emollient
4	Glycerin	4.000	56-81-5	Denaturant
5	Sodium Hyaluronate	4.000	9067-32-7	Skin Conditioning Agent
6	Cetearyl Alcohol	3.000	8005-44-5	Emulsion Stabilizer
7	Niacinamide	2.000	98-92-0	Skin Conditioning Agent-Miscellaneous
8	Caprylic/Capric Triglyceride	2.000	65381-09-1	Skin Conditioning Agent-Occlusive
9	1,2-Hexanediol	1.500	6920-22-5	Solvent
10	Glyceryl Stearate	1.200	123-94-4	Surfactant-Emulsifying Agent
	PEG-100 Stearate		9004-99-3	Surfactant-Cleansing Agent
11	Camellia Sinensis Leaf Extract	1.000	84650-60-2	Skin Conditioning Agent-Emollient
	Xylitylglucoside		1095751-96-4	Skin Conditioning Agent-Humectant
12	Anhydroxylitol	1.000	53448-53-6	Skin Conditioning Agent-Humectant
	Xylitol		87-99-0	Skin Conditioning Agent-Humectant
13	Squalane	1.000	111-01-3	Skin Conditioning Agent - Occlusive
14	Beeswax	1.000	8006-40-4 (White)	Binder
15	Betain	1.000	107-43-7	Humectant
16	Galactomyces Ferment Filtrate	1.000	INCI Monograph ID: 12796	Skin-Conditioning Agent- Humectant
17	Butyrospermum Parkii (Shea) Butter	1.000	91080-23-8	Skin Conditioning Agent-Occlusive
18	Olea Europaea (Olive) Fruit Oil	1.000	8001-25-0	Skin Conditioning Agent-Occlusive
19	Macadamia Ternifolia Seed Oil	1.000	128497-20-1	Skin Conditioning Agent-Occlusive
20	Acetyl Hexapeptide-8	1.000	616204-22-9	Skin Conditioning Agent-Miscellaneous
21	Copper Tripeptide-1	1.000	INCI Monograph ID: 12723	Skin Conditioning Agent-Miscellaneous
22	Palmitoyl Tripeptide-1	1.000	INCI Monograph ID: 12826	Skin Conditioning Agent-Miscellaneous
	Nelumbo Nucifera Flower Extract	1.000	85085-51-4	Skin Conditioning Agent-Miscellaneous
	Iris Versicolor Extract		90045-93-5	Skin Conditioning Agent-Miscellaneous
	Leontopodium Alpinum Flower/Leaf Extract		391900-47-3	Skin Conditioning Agent-Miscellaneous
23	Lilium Candidum Flower Extract		INCI Monograph ID: 11091	Skin Conditioning Agent-Miscellaneous
	Jasminum Officinale (Jasmine) Flower Extract		INCI Monograph ID: 17565	Fragrance
	Freesia Refracta Extract		INCI Monograph ID: 10225	Skin Conditioning Agent-Miscellaneous
	Rosa Centifolia Flower Extract		84604-12-6	Skin Conditioning Agent-Miscellaneous
24	Aloe Barbadensis Leaf Extract		1.000	85507-69-3
25	Polysorbate 60	0.500	9005-67-8	Surfactant-Solubilizing Agent
26	Sorbitan Sesquioleate	0.500	8007-43-0	Surfactant-Emulsifying Agent
27	Caprylyl Glycol	0.300	1117-86-8	Skin Conditioning Agent-Emollient
28	Hydroxyethyl Acrylate/Sodium Acryloyldimethyl Taurate Copolymer	0.300	111286-86-3	Viscosity Increasing Agent-Aqueous
29	Arginine	0.280	74-79-3	Skin Conditioning Agent-Miscellaneous
30	Carbomer	0.250	9003-01-04	Viscosity Increasing Agent-Aqueous
31	Tocopheryl Acetate	0.100	58-95-7	Skin Conditioning Agent-Miscellaneous
	Aniba Rosodora (Rosewood) Wood Oil	0.100	8015-77-8	Fragrance Ingredient
	Geranium Maculatum Oil		INCI Monograph ID: 9253	Fragrance Ingredient
32	Lavandula Angustifolia (Lavender) Oil		8000-28-0	Fraacrance Inaredient
	Citrus Aurantium Dulcis (Orange) Oil		8008-57-9	Fragrance Ingredient
33	Panthenol	0.100	16485-10-2	Skin Conditioning Agent-Miscellaneous
34	Chlorphenesin	0.100	104-29-0	Preservatives
35	Adenosine	0.040	58-61-7	Skin Conditioning Agent-Miscellaneous
36	Disodium EDTA	0.030	139-33-3	Chelating Agent

2). 시작품의 기능성합량 성적서

the way to trust **KCL**



5796-8468-4806-2025

시험성적서

COPY 복사본

1. 성적서 번호 : CT20-007765K
2. 의뢰자
 - 업체명 : (주)제너럴네이처
 - 주소 : 전북 순창군 순창읍 민속마을길 61-27, 3층
3. 시험기간 : 2020년 01월 15일 ~ 2020년 01월 23일
4. 시험성적서의 용도 : 참고용
5. 시료명 : GN190515(2별) [제조번호/제조일자/사용기한:GN190515/-/-]
6. 시험방법
 - (1) 자사기준 및 시험방법
7. 시험결과
 - 1) GN190515(2별) [제조번호/제조일자/사용기한:GN190515/-/-]

시험항목	단위	기준치	시험방법	시험결과	비고	시험장소
나이아신아마이드 확인	-	검액의 주피크는 표준액의 주피크와 같다	(1)	기준에 적합	-	A
나이아신아마이드 함량	%	표시함량의 90.0 이상 (표시함량 : 2.0)	(1)	103.7		
아데노신 확인	-	검액의 주피크는 표준액의 주피크와 같다	(1)	기준에 적합		
아데노신 함량	%	표시함량의 90.0 이상 (표시함량 : 0.04)	(1)	109.8		

※ 시험장소
A : 서울특별시 금천구 가산디지털1로 199 (가산동)

----- 끝 -----

확인	작성자 성명	한소애		기술책임자 성명	조민정	
----	-----------	-----	---	-------------	-----	---

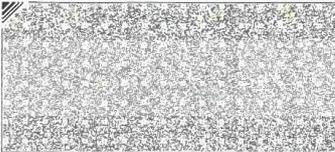
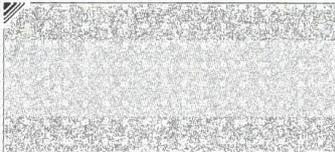
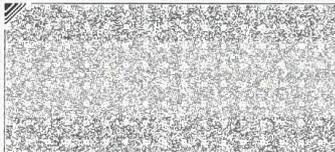
비고 : 1. 이 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인정과 관련이 없으며, 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명에 한정된 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다.
2. 이 성적서는 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.
3. 이 성적서의 일부만을 발췌하여 사용한 결과는 보증할 수 없습니다.
4. 이 성적서의 진위여부는 홈페이지(www.kcl.re.kr)에서 확인 가능합니다.

2020년 01월 23일

한국건설생활환경시험연구원 

결과문의 : 54852 전라북도 전주시 덕진구 여산로 136 (여의동) ☎ (063)711-6007

총 1페이지 중 1페이지 양식TQP-12-01-03(1)

2-3-2. 녹차초임계추출물의 인체적용시험
가. 인체피부 일차자극 시험

신뢰성 보증 확인서

- 연구명: 'GN190515[녹차초임계추출물]'에 대한 인체피부 일차자극 시험
- 연구 코드: CDS-2000-001-20
- 프로토콜 코드: TPCS-VAGF-050
- IRB 심의번호: CDIRB-QR-20-001

본 연구는 MFDS 관련규정, PCPC Guideline 및 ㈜코어덤 피부과학연구소의 표준작업지침서(SOP)에 따라 계획 및 수행되었으며, 모든 절차는 신뢰성 보증인이 점검하였습니다.

□ 신뢰성 보증인 점검내역

점검 항목	확인 일자	연구책임자 및 연구기관장 보고 일자
연구계획서	2019. 12. 26	2019. 12. 26
IRB 계획심의 승인	2019. 12. 26	2019. 12. 26
연구대상자 모집 및 준비	2019. 12. 30 ~ 2020. 1. 4	2019. 12. 30, 2020. 1. 4
연구기간	2020. 1. 7 ~ 1. 10	2020. 1. 7, 1. 10
IRB 시험종료 보고	2020. 1. 10	2020. 1. 10
초안 보고서	2020. 1. 17	2020. 1. 17
보고서 승인	2020. 1. 21	2020. 1. 21

본 연구는 위와 같이 진행되었으며, 이에 따른 연구 결과를 정확히 반영하여
본 연구 결과 보고서를 작성하였음을 증명합니다.

2020년 1월 21일

신뢰성보증인 조준환



연구기관장 김은정



보고서 요약문

연구명	GN190515[녹차초임계추출물]에 대한 인체피부 일차자극 시험		
연구 코드	CDS-2000-001-20	연구 기간	2020. 1. 7 ~ 1. 10
연구 목적	본 연구는 추출물 1 종에 대하여 인체피부 안전성 측면에서 일차자극 정도를 평가하고자 한다.		
연구 방법	<ol style="list-style-type: none"> 1. 연구 대상: 선정기준 및 제외기준에 의한 20~60세의 건강한 여성 지원자 32명 2. 측정 방법: 48시간 단일접포 시험 (48hr single patch test) <ul style="list-style-type: none"> - 접포 부위: 등 - 접포 시간: 48시간 폐쇄접포 - 평가 시점: 접포 제거 30분 및 24시간 후 관찰 - 평가 기준: Frosch & Kligman, ICDRG 및 PCPC guideline 		
연구 결과	<ol style="list-style-type: none"> 1. 연구대상자 선정 본 연구는 총 32명의 연구대상자로 시작하였으며 모든 연구대상자가 시험 전 과정을 성실하게 참여하였다. 연구대상자들의 평균 연령은 42.1±7.6 세로 최고 연령은 50 세, 최저 연령은 24 세였다. 2. 일차자극 평가 본 시험물질은 모든 연구대상자들에게서 접포 제거 30분 및 24시간 후 관찰 시점에 아무런 피부 반응도 관찰되지 않았다. 		
	번호	시험 물질	피부자극도
	1	GN190515[녹차초임계추출물]	0.00
	2	Squalene (Negative control, 음성대조군)	0.00
결론	위 결과를 근거로 ㈜제너럴네이처의 'GN190515[녹차초임계추출물]'은 자극도 분류 기준에 따라 인체 피부 일차자극 측면에서 저자극 물질로 판단된다.		

1. 연구 목적

본 연구는 추출물 1 종에 대하여 인체피부 안전성 측면에서 일차자극 정도를 평가하기 위함이다.

2. 연구 기간

본 연구는 2020 년 1 월 7 일부터 2020 년 1 월 10 일까지 진행하였다.

3. 시험 물질

의뢰기관으로부터 제공받은 시험물질은 연구코드 및 일시 등의 정보를 기재한 라벨을 부착하여 보관하며, 시험물질에 대한 정보는 다음과 같다(Table 1).

Table 1. 시험물질 정보

물질번호	명칭	Lot. No	성상	농도
1	GN190515[녹차초임계추출물]	GN190515	액상	5% in Squalene
2	Squalene (Negative control, 음성대조군)	-	-	As is

4. 연구 방법

4-1. 연구대상자 선정

본 연구는 선정기준에 부합하고 제외기준에 해당되지 않은 여성 지원자 32 명을 대상으로 진행 되었다. 선정된 연구대상자에게 연구의 목적과 방법 그리고, 기대 효능과 부작용을 설명하여 참여의사를 보이는 자는 연구 참가 동의서를 작성하고 연구에 참여하도록 하였다.

4-1-1. 선정 기준

- ① 20세~60세의 남성 또는 여성으로 건강한 지원자
- ② 연구의 목적, 내용 등에 관하여 연구자로부터 충분히 설명을 듣고 자발적으로 임상 연구 참가 동의서를 작성하고 서명한 자
- ③ 연구 기간 동안 동일한 시간에 방문 가능하며 추적 관찰이 가능한 자

4-1-2. 제외 기준

- ① 임신, 수유 중 또는 6개월 이내에 임신을 계획하고 있는 자
- ② 정신과적 질환이나 감염성 피부질환이 있는 자
- ③ 만성 소모성 질환이 있는 자(천식, 당뇨, 고혈압, 갑상선 기능 항진증 및 저하증 등)
- ④ 피부질환, 피부알레르기, 민감성, 과민성 피부 및 아토피 피부염을 가지고 있는 자
- ⑤ 시험부위에 점, 여드름, 모세혈관확장, 홍반, 흉터 등이 있어 측정하기 곤란한 자
- ⑥ 시험부위에 피부질환의 치료를 위해 항균제, 면역억제제, 스테로이드가 함유된 피부 외용제 및 만성피부질환 치료제를 1개월 이상 사용하고 있는 자
- ⑦ 화장품, 의약품 또는 일광노출에 자극이 심하거나 알러지가 있는 자
- ⑧ 접촉성 테이프에 자극 또는 알러지가 심한 자
- ⑨ 니켈을 포함한 금속제품에 알러지가 있는 자
- ⑩ 피임제, 항히스타민제, 소염제를 복용하고 있는 자
- ⑪ 동일한 연구에 참가한 뒤 1개월이 경과되지 않은 자
- ⑫ 본 임상연구소의 임직원인 자
- ⑬ 그 외 연구책임자의 판단으로 본 연구에 적합하지 않다고 판단되는 자

4-1-3. 연구대상자 수 산정기준

본 연구의 연구대상자 산정기준은 기능성 화장품 등의 심사에 관한 규정의 [별표 1] 독성시험법 7 항 (1) 인체 첩포 시험방법에 근거하여 30 명 이상을 선정하였다.

4-2. 연구 중단 및 탈락 기준

본 연구에 참여한 연구대상자는 언제든지 연구참여를 중단 및 철회할 수 있으며 연구자는 다음의 사유가 발생하면 연구대상자를 본 연구에서 탈락시키도록 하고 연구 결과 산정에서 제외 하였다. 연구대상자가 탈락된 경우 연구자는 아래 중 해당하는 탈락 사유 항목을 명시하고 이외에 특이사항을 기록하여 연구책임자에게 보고하였다.

① 연구대상자가 참여 동의를 자발적으로 철회한 경우

연구대상자의 불의의 사고 혹은 개인적인 이유 및 임상실험 진행에 대한 거부 등으로 인하여 참여철회 요청이 있을 경우

② 시험제품에 의해 시험부위에 이상반응이 발생한 경우

시험부위에 소양감이나 가려움 등의 주관적 자극 반응 및 홍반 등의 객관적인 반응이 심각하게 일어나 연구진행이 불가능한 경우

③ 시험제품 사용방법 및 프로토콜에 따른 준수사항을 따르지 않은 경우

연구대상자가 시험부위에 과도한 자외선 노출, 지나친 음주, 흡연 등으로 인해 연구결과에 장애가 발생한 경우나 첩포를 임의로 제거한 경우

④ 추적관찰 실패 등 기타 연구자의 판단에 의해 연구수행에 지장이 있다고 생각되는 경우 연구기간 중 연구대상자의 불의의 사고 및 개인적 사유 이외에 연락두절, 평가일정에 방문하지 않음 등의 이유로 추적관찰에 실패한 경우

⑤ 위 항목 이외의 이유로 시험 결과 산정에 포함할 수 없는 경우

연구 종료 시 주요한 검사항목이 누락되었거나 데이터 훼손 등으로 인해 결과산정에 포함될 수 없거나 기타의 이유로 연구결과 산정에 포함할 수 없는 경우

4-3. 연구대상자의 준수사항

4-3-1. 연구대상자의 제한사항

① 연구기간 동안 시험부위에 스테로이드제제나 외용제 등을 바르지 않도록 하였다.

② 항히스타민제, 소염제 등을 복용하지 않도록 하였다.

③ 첩포 부위에 물이 들어가지 않도록 하였다.

특히 사우나, 수영장, 땀이 많이 나는 운동 등은 금하도록 하였다.

4-3-2. 연구대상자의 의무사항

① 연구대상자의 제한사항을 성실히 이행하며 검사일정을 준수하도록 하였다.

② 연구기간 중 연구대상자에게 발생하는 모든 증상을 상세하고 빠짐없이 연구자에게 보고하도록 하였다.

③ 연구자의 질문, 설문 등 모든 자료에 성실하고 정직하게 작성하도록 하였다.

4-4. 연구 재료

① IQ Ultra (Chemotechnique Diagnostics AB, Sweden)

② Microman M100 (Gilson, France)

③ Micropore tape (3M/ Medical-Surgical Division)

④ Marking pen (Skin marker Slim, Sweden)

4-5. 첩포 및 평가 방법

본 시험물질은 스쿠알렌(Squalene)으로 5% 희석하여 적용하였다. 시험물질을 IQ Ultra chamber 에 20 μ l 씩 적하시킨 다음 70% 에탄올로 연구대상자의 시험부위인 등을 닦고, 건조시

킨 후에 부착하였다. 시험물질은 48 시간 동안 폐쇄 첩포하며, 첩포를 제거한 후에는 마킹펜 (skin marker) 으로 시험 부위를 표시하고 첩포 제거 30 분 및 24 시간 후에 확대경(SK101-3X, SeKi optical, Korea) 아래서 피부 반응을 관찰하였다(Table 2).

Table 2. 평가 절차

순서	첩포 전 (0 시간)	첩포 제거 30 분 후 (48 시간)	첩포 제거 24 시간 후 (72 시간)
연구대상자 선정 및 기초조사	√	-	-
시험물질 첩포	√	-	-
첩포 제거 30 분 후 피부 반응 관찰	-	√	-
첩포 제거 24 시간 후 피부 반응 관찰	-	-	√

4-5-1. 피부 반응 평가기준

피부 반응 평가는 Frosch & Kligman 1979, PCPC guideline 과 International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG)을 반영한 기준(Table 3)에 따라 평가하였다.

Table 3. 피부 반응 평가 기준

점수 (Score)	기호 (Mark)	설명 (Description)	반응양상 (Images of skin reaction)
0	-	반응 없음 (No reaction)	-
0.5	±	의심스럽거나 희미한 홍반 반응 (Barely perceptible erythema, Doubtful or questionable reaction)	
1	+	약하지만 뚜렷하게 보이는 홍반 반응 (Slight erythema, either spotty or diffuse)	
2	++	뚜렷한 홍반이 보이며 구진 혹은 부종을 동반한 홍반 반응 (Moderate uniform erythema)	
3	+++	부종 및 구진을 동반한 강한 홍반 반응 (Intense redness with edema)	
4	++++	부종과 수포를 동반한 강한 홍반 반응 (Intense redness with edema & vesicles)	

4-5-2. 피부 반응도 산출 및 피부 자극도 판정

첨포 제거 30분 및 24시간 후 시점에서의 각 물질에 대한 피부 반응도를 아래와 같이 산출하였고, 이를 기준으로 두 시점의 피부 반응도의 평균을 구하여 Table 4 의 기준에 따라 피부 자극도를 판정하였다.

$$\text{피부 반응도} = \frac{\Sigma (\text{Score} \times \text{No. of Responders})}{4 (\text{Maximum score}) \times N (\text{Total subjects})} \times 100$$

Table 4. 피부 자극도 판정 기준

평균 피부 반응도 (Mean score)	판정
0.00 ~ 0.87	저자극
0.88 ~ 2.42	경자극
2.43 ~ 3.44	중자극
3.45 이상	강자극

Ref: International Journal of Cosmetic Science 2014, 36, 62-67

5. 연구 결과

5-1. 연구대상자 피부 특성

Table 5. 연구대상자 피부 특성 (n=32)

항목	분류	빈도(수)	비율(%)
연령	20 대	3	9.38
	30 대	5	15.63
	40 대	23	71.86
	50 대	1	3.13
	피부 타입	건성	15
피부 타입	중성	5	15.63
	지성	3	9.38
	복합성	9	28.13
	문제성 피부	0	0.00
	피부 수분	촉촉함	0
보통		20	62.50
부족함		12	37.50

항목	분류	빈도(수)	비율(%)
피부 유분	매우 번들거림	1	3.13
	보통	24	75.00
	부족함	7	21.87
수면시간 (1 일)	5 시간 미만	4	12.50
	5~8 시간	25	78.12
	8 시간 초과	3	9.38
자외선 노출시간 (1 일)	1 시간 미만	8	25.00
	1~3 시간	22	68.75
	3 시간 초과	2	6.25
흡연 여부 (1 일)	안 핀다	32	100.00
	10 개피 미만	0	0.00
	10 개피 이상	0	0.00
	한 갑 이상	0	0.00
자극 감수성	예	1	3.13
	아니오	31	96.87
따가움/가려움 감수성	예	0	0.00
	아니오	32	100.00
이상반응 경험	예	0	0.00
	아니오	32	100.00
생리 중 피부 변화 유무	예	2	6.25
	아니오	30	93.75
생리 주기	생리 일주일 전	11	34.37
	생리 중	5	15.63
	생리 후 일주일 이내	8	25.00
	기타	8	25.00

본 연구는 총 32 명의 연구대상자로 시작하였으며 모든 연구대상자가 시험 전 과정을 성실하게 참여하였다. 연구대상자들의 평균 연령은 42.1 ± 7.6 세로 최고 연령은 50 세, 최저 연령은 24 세였다(Table 5, 별첨 1).

5-2. 피부 반응 평가 결과

본 시험물질(1 번 물질)은 모든 연구대상자들에게서 첩포 제거 30 분 및 24 시간 후 관찰 시점에 아무런 피부 반응도 관찰되지 않았다(Table 6, 별첨 2).

Table 6. 물질별 피부 반응 결과 (n=32)

물질 번호	명수 ¹ (n)	첩포 제거 30 분 후(48 시간)						첩포 제거 24 시간 후(72 시간)						평균 ² 반응도
		0.5±	1+	2+	3+	4+	반응도	0.5±	1+	2+	3+	4+	반응도	
1	0	-	-	-	-	-	0.00	-	-	-	-	-	0.00	0.00
2	0	-	-	-	-	-	0.00	-	-	-	-	-	0.00	0.00

¹명수: 피부 반응자 총 수

²평균반응도: 반응도 (48 시간의 반응도 + 72 시간의 반응도) / 2

6. 결론

위 결과를 근거로 (주)제너럴네이처의 ‘GN190515[녹차초임계추출물]’은 자극도 분류 기준에 따라 인체피부 일차자극 측면에서 저자극 물질로 판단된다.

나. 인체적용시험

보고서 요약문

연구명	'녹차크림(가칭)' 사용에 의한 대조군 비교 인체피부 개선효과 평가시험		
연구 코드	CDE-2000-011	연구 기간	2020. 2. 3 - 3. 4
연구 목적	본 연구는 시험제품 4 주 사용에 의한 인체피부에서의 보습(수분량), 탄력, 처짐(리프팅), 치밀도 및 밝기를 대조제품과 비교 평가하기 위함이다.		
시험 제품	녹차크림(가칭)(Lot. No. GN190515)		
유효 성분	녹차초임계추출물		
연구 방법	<ol style="list-style-type: none"> 1. 연구 대상: 44~55 세(평균 49.8±3.0)의 여성 지원자 22 명 2. 측정 방법: 본 연구 목적에 적합한 연구대상자들을 대상으로 시험제품 및 대조제품을 각각 좌측 또는 우측 안면에 4주간 사용하게 하였다. 제품 사용 전 및 4 주 사용 후에 피부 수분량, 탄력, 처짐(리프팅), 치밀도 및 밝기를 측정하였고, 제품의 효능 및 사용성 설문평가와 안전성 평가를 실시하였다. 		
연구 결과	<ol style="list-style-type: none"> 1. 시험군 및 대조군 동질성 검증 분석 제품 사용 전의 피부 수분량, 탄력, 처짐(리프팅), 치밀도 및 밝기 값이 두 군간 유의한 차이가 없었으므로 사전 값이 동질 하다고 판단하였다($p>0.1$). 2. 피부 수분량 분석 제품 사용 전과 비교 시 4 주 사용 후 시험군의 뺨 부위 피부 수분량이 3.76% 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 또한, 4 주 사용 후 피부 수분 변화량이 시험군과 대조군 간에 유의한 차이가 있어($p<0.05$) 시험군이 대조군에 비해 피부 보습이 개선되었음을 확인하였다. 3. 피부 탄력 분석 제품 사용 전과 비교 시 4 주 사용 후 시험군의 뺨 부위 탄력 값(Area)이 10.06% 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 또한, 4 주 사용 후 탄력 값(Area)의 변화량이 시험군과 대조군 간에 유의한 차이가 있어($p<0.05$) 시험군이 대조군에 비해 피부 탄력이 개선되었음을 확인하였다. 4. 피부 처짐(리프팅) 분석 제품 사용 전과 비교 시 4 주 사용 후 시험군의 뺨 부위 처짐(등고선) 각도가 2.19% 유의하게 감소하였다($p<0.05$). 또한, 4 주 사용 후 피부 처짐 각도 변화량이 시험군과 대조군 간에 유의한 차이가 있어($p<0.05$) 시험군이 대조군에 비해 피부 처짐(리프팅)이 개선되었음을 확인하였다. 5. 피부 치밀도 분석 제품 사용 전과 비교 시 4 주 사용 후 시험군의 뺨 부위 피부 치밀도가 8.69% 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 또한, 4 주 사용 후 피부 치밀도 변화량이 시험군과 대조군 간에 		

1. 연구 목적

본 연구는 시험제품 4주 사용에 의한 인체피부에서의 보습(수분량), 탄력, 리프팅(처짐), 치밀도 및 붉기를 대조제품과 비교 평가하기 위함이다.

2. 시험제품 정보

의뢰기관으로부터 제공받은 시험제품은 연구코드 및 일시 등의 정보를 기재한 라벨을 부착하여 보관한다.

2-1. 제품명: 녹차크림(가칭)(Lot. No. GN190515)

2-2. 제품의 유효성분: 녹차초임계

2-3. 제품의 사용법: 1일 2회(아침, 저녁) 세안 후 시험제품 및 대조제품 적당량을 각각 왼쪽 또는 오른쪽 피부에 골고루 도포하였다.

3. 연구 방법

3-1. 연구대상자 선정

본 연구는 선정기준에 부합하고 제외기준에 해당되지 않은 여성 연구대상자 23 명을 대상으로 진행되었으며, 모든 평가는 연구대상자가 세안한 후 항온항습(22±2℃, 50±5%) 조건에서 20 분간 적용한 후 실시하였다.

3-1-1. 선정 기준

- ① 20-60세의 여성 지원자
- ② 연구의 목적, 내용 등에 관하여 연구자로부터 충분히 설명을 듣고 자발적으로 임상 연구 참가 동의서를 작성하고 서명한 자
- ③ 연구 기간 동안 동일한 시간에 방문 가능하며 주적 관찰이 가능한 자

3-1-2. 제외 기준

- ① 임신, 수유 중 또는 6개월 이내에 임신을 계획하고 있는 자
- ② 정신과적 질환이나 감염성 피부질환이 있는 자
- ③ 만성 소모성 질환이 있는 자(천식, 당뇨, 고혈압, 감작성 기능 항진증 및 저하증 등)
- ④ 피부질환, 피부알레르기, 민감성, 과민성 피부 및 아토피 피부염을 가지고 있는 자
- ⑤ 시험부위에 점, 여드름, 모세혈관확장, 홍반, 흉터 등이 있어 측정하기 곤란한 자
- ⑥ 시험부위에 피부질환의 치료를 위해 항균제, 면역억제제, 스테로이드가 함유된 피부 외용제 및 만성피부질환 치료제를 1개월 이상 사용하고 있는 자
- ⑦ 화장품, 의약품 또는 일광노출에 자극이 심하거나 알러지가 있는 자
- ⑧ 연구시작 전 3개월 내에 시험부위에 동일 또는 유사한 효능 화장품 및 의약품 등을 사용한 자
- ⑨ 연구시작 전 6개월 내에 시험부위에 피부과적 시술(제모, 보톡스, 필러, 레이저시술, 기타 피부 관리 등)을 받은 자
- ⑩ 피임제, 항히스타민제, 소염제를 복용하고 있는 자
- ⑪ 동일한 연구에 참가한 뒤 3개월이 경과되지 않은 자

㉔ 본 임상연구소의 임직원인 자

㉕ 그 외 연구책임자의 판단으로 본 연구에 적합하지 않다고 판단되는 자

3-1-3. 연구 중단 및 탈락 기준

본 연구에 참여한 연구대상자는 언제든지 연구참여를 중단 및 철회할 수 있으며 연구자는 다음의 사유가 발생하면 연구대상자를 본 연구에서 탈락시키고 연구결과 산정에서 제외하였다. 연구대상자가 탈락된 경우 연구자는 아래 중 해당하는 탈락 사유 항목을 명시하고 이외에 특이사항을 기록하여 연구책임자에게 보고하였다.

① 연구대상자가 참여 동의를 자발적으로 철회한 경우

연구대상자의 불의의 사고 혹은 개인적인 이유 및 임상실험 진행에 대한 거부 등으로 인하여 연구대상자로부터 참여철회(중단) 요청이 있을 경우

② 시험제품에 의해 시험부위에 이상반응이 발생한 경우

측정부위에 소양감이나 홍반 등의 객관적인 반응이 일어나거나 심각한 피부 이상반응이 나타나 연구진행이 불가능한 경우

③ 시험제품 사용방법 및 프로토콜에 따른 준수사항을 따르지 않은 경우

연구대상자가 연구기간 동안 측정부위에 과도한 자외선 노출, 지나친 음주, 흡연 등으로 인해 연구결과에 장애가 발생한 경우나 시험제품을 사용방법에 따라 사용하지 않은 경우

④ 추적관찰 실패 등 기타 연구자의 판단에 의해 연구수행에 지장이 있다고 생각되는 경우

연구기간 중 연구대상자의 불의의 사고 및 개인적 사유 이외에 연락두절, 평가일에 방문하지 않음 등의 이유로 추적관찰이 어려운 경우

⑤ 위 항목 이외의 이유로 연구결과산정에 포함할 수 없는 경우

연구 종료 시 주요한 검사항목이 누락, 데이터 오류 또는 훼손 등으로 인해 결과 산정에 포함될 수 없거나 기타 이유로 연구결과에 포함할 수 없는 경우

3-1-4. 연구대상자 수 산정기준

본 연구는 결과 데이터가 통계적으로 유효성 비교가 가능하게 하기 위한 최소한의 수인 20 명 이상을 모집하여 실시하였다(기능성 화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인, 화장품 표시, 광고 실증을 위한 시험방법 가이드라인, 2018).

3-2. 피부 수분량 측정

피부 수분량의 측정은 Corneometer® CM825 (C+K, Germany)를 이용하였으며, 이는 각질층 내 수분 함량을 측정하는 기기이다. 모든 전기적 현상은 전하에 의해 일어나는데, 정전용량(Capacitance)은 이 전하를 저장하는 능력을 의미하며, probe 의 양극판이 대전상태에 놓이면 그 사이에 전기장을 형성하게 된다. 이때 발생하는 전하를 저장하는 원리를 이용하여 전기에 대한 높은 저항을 갖고 있는 표피의 각질층 내 수분 함량을 측정한다. 측정된 정전용량은 피부의 수분 함량에 따라 변화하며, 정전용량과 각질층 내 수분 함량은 비례하므로 측정값이 높을수록 수분 함량도 높다(Fig. 2).

본 연구에서는 제품 사용 전 및 4 주 사용 후에 좌측 및 우측 뺨 부위를 3 회 측정한 후 평균값을 분석하였다.

6. 결론

썬코어덤 피부과학연구소는 썬제너럴네이처의 "녹차크림(가칭) 사용에 의한 대조군 비교 인체피부 개선효과 평가시험" 연구를 위탁 받아 2020년 2월 3일부터 3월 4일까지 진행하였다. 본 연구는 시험제품 4주 사용에 의한 인체피부에서의 보습(수분량), 탄력, 리프팅(처짐), 치밀도 및 밝기를 대조제품과 비교 평가하기 위함이다.

연구결과 설명.

위 결과를 근거로 ----- 개선에 도움을 주는 것으로 판단된다.

2절. 제1 협동기관 : 남부대학교

1. 연구개발 추진전략 및 방법

가. 연구개발 추진전략

본 연구팀은 제 3 협동기관인 (주)세원씨엔에스의 식품관련 사업화를 지원하기 위하여, 본 연구팀이 보유하고 있는 기술 노하우를 산학협력을 바탕으로 공유하면서 연구를 추진하였다. 특히, 녹차의 지용성물질에 대한 다양한 연구와 수용성 차 제품의 새로운 형태를 개발하기 위하여 다양한 시도와 연구를 진행하였다.

나. 연구개발 방법

(1). 차엽의 특성 연구

(1)-1. 실험재료 및 전처리

보성 녹차밭에서 초봄(11월)에 가지치기 과정에서 발생하는 녹차나무 잎을 추출용시료로 사용하였다. 상업용으로 판매되는 녹차잎차를 구매하여 시료로 사용하였다.

(1)-2 건조 차엽 제조

차엽을 건조오븐에서 60℃에서 3시간 동안 건조하여 건조차엽을 제조하였다.

(1)-3. 차엽으로부터 헥산을 이용한 지용성 성분 추출

건조 차엽을 믹서기에 분쇄 후 분쇄차엽 250g을 측정하여 유리재질의 병 (4 L용량)에 옮겨 넣었다. 50℃로 가열한 Hexane 1.5 L를 시료에 첨가한 후, 항온 수조 50℃에 30분 정치한 후 상등액을 회수 하였다. 2차로 같은 용매 1.5 L를 넣고 동일한 방법으로 추출하였고, 3차로는 1 L를 넣어 차엽으로부터 성분을 추출하였다. 추출한 헥산은 모두 한곳으로 합하여 필터한 후 감압농축하였다.

(1)-4. 차엽으로부터 초임계 이산화탄소 유체 추출장치를 이용한 지용성 성분 추출

건조 차엽을 믹서기에 분쇄 후 분쇄차엽 200g을 측정하여 초임계 유체 추출장치에 옮겨 넣었다. 추출조건은 50℃로 하여 추출조 압력을 400 bar에서 보조용매로 에탄올을 사용하여 1시간 30분 동안 지용성 성분을 추출하였다.

(1)-5. 차엽으로부터 식용유를 이용한 지용성 성분 추출

건조 차엽을 믹서기에 분쇄 후 분쇄차엽 1 kg을 측정하여 삼각플라스크에 옮겨 넣었다. 추출조건은 50℃ 추출용매로 식용유를 사용하여 1시간 30분 동안 지용성 성분을 추출하였다.

(1)-6. 분석을 위한 시중판매 녹차엽으로부터 헥산을 이용한 지용성 성분 추출

건조 차엽을 믹서기에 분쇄 후 분쇄차엽 2g을 측정하여 유리재질의 병 (100 mL용량)에 옮겨 넣었다. 50℃로 가열한 0.002% BHA함유 Hexane 15 mL를 시료에 첨가한 후, 항온 수조 40℃에 30분 126 rpm으로 진탕한 후 상등액을 회수 하였다. 2차로 같은 용매 15 mL를 넣고 동일한 방법으로 추출하였고, 3차로는 10 mL를 넣어 차엽으로부터 성분을 추출하였다. 추출한 헥산은 모두 한곳으로 합하여 50 mL로 정용한 후 필터하였다.

(1)-7 차엽 지용성 추출물의 비누화 반응을 이용한 불검화물 수거

지용성 녹차 추출물은 12% ehtanolic KOH용액으로 항온수조에서 60C에서 90분간 반응한 후 0.02% 함유 헥산으로 수회 추출하여 불검화물을 얻었다.

(1)-8 차엽 지용성 추출물의 TMS화 반응 (Trimethylsilylation reaction)

Saponification 후 얻은 불검화물 시료를 1mL Hexane에 용해한 후, 시료 500 μ L vial에 옮겨 담고, 질소가스를 사용하여 용매를 증발 농축시켰다. 이곳에 다시 Na₂SO₄로 탈수한 Chloroform을 200ul와 BSTFA in 1% TMCS를 400ul를 첨가하고, 항온수조에서 80°C 에서 30분간 TMS화 반응을 시킨다.

(1)-9. 차엽 지용성 추출물의 폴리코사놀 분석

위에 기술한 방법으로 TMS화한 시료를 GC-MS/M를 이용하여 다음과 같은 조건에서 폴리코사놀 함량을 분석한다.

Gas Chromatograph-MS/MS 분석조건

- Model : Shimadzu-Triple Quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Tokyo, Japan)
- Injection Volume = 1 μ L
- Injection temp(°C) = 315°C
- Split ration = 1 : 3
- Capillary column DB-5MS (30m X 0.25mm I.D.)

(1)-10. 차엽 추출물의 phytosterol 분석

유지를 검화한 후 불검화물을 헥산으로 추출하였다. 추출한 불검화물들은 TMS화 반응을 시킨 후, TMS화 반응이 끝난 시료를 GC (GC-2010, Simadzu, Japan)에 주입하여 분석하였다. 사용한 컬럼은 Capillary column Rtx®-1 (30m X 0.25mm I.D., film thickness 0.25 μ m, RESTEK International, Belleford, PA, USA) 이었다. 주입구 및 검출기 온도는 각각 315°C 및 315°C 이었다.

(1)-11. 차엽 지용성 추출물의 토코페롤함량 측정

유지를 검화한 후 불검화물을 헥산으로 추출하였다. 추출한 불검화물들은 TMS화 반응을 시킨 후, TMS화 반응이 끝난 시료를 GC (GC-2010, Simadzu, Japan)에 주입하여 분석하였다. 사용한 컬럼은 Capillary column Rtx®-1 (30m X 0.25mm I.D., film thickness 0.25 μ m, RESTEK International, Belleford, PA, USA) 이었다. 주입구 및 검출기 온도는 각각 315°C 및 315°C 이었다.

(1)-12. 차엽 추출물의 인지질분석

- 해당하는 실험 유지를 SPE로 분획하여 인지질을 얻은 후 HPLC-ELSD를 이용하여 인지질을 분석하였다. 분석용 칼럼은 Alltech alpha bond silica (5 μ m, 3.5x 150 mm)이었다. 사용한 용매는 (A) isoocatane:tetrahydrofuran: isopropanol : chloroform : water (415: 5: 446: 104: 30) (B) isoocatane:tetrahydrofuran: isopropanol : chloroform : water (216: 4: 546: 154: 80)이었다. 이동상은 이들 용매를 gradient로 하여 1.2 mL/min의 속도로 흘리면서 분석하였다.

(2). 차엽으로 부터 초임계추출 조건 최적화

(2)-1. 재료 및 시약

국내에서는 지리적 표시제 1호 특산품으로 2002년 1월 ‘보성녹차’가 등록되었다. 본 실험에서 사용한 녹차 원료는 전라남도 보성군 보성녹차 조합에서 구매하여 사용하였으며 원료는 동결 건조시킨 후 500 μ m 로 파쇄를 한 후 추출 전까지는 건냉 암소에 보관하였다. 주용매인 이산화탄소는 순도 99% 이상의 식품용을 사용 하였으며 보조용매로는 95% ethanol을 사용하였다. 그 외의 분석 및 전 처리 시 사용된

시약은 분석용 1급 시약을 사용하였다. 추출물의 분석을 위한 표준시료들은 각각 폴리코사놀 standard (Sigma, U.S.A)와 polyphenol standard (Sigma, U.S.A)를 구입하여 사용하였다.

(2)-2. 실험방법

(2)-2-1. 초임계 이산화탄소 추출

(2)-2-1-1. 초임계이산화탄소 추출장치

본 사업은 당초에 대량생산 공정에서 추출한 녹차엽으로부터 폴리코사놀을 분리 동정하였으며, 2차년도 과제를 진행하는 동안 다양한 추출방법을 통한 폴리코사놀 함량 분석과 경제성을 확인하기 위하여 소규모 초임계 장치를 통하여 폴리코사놀 함량을 확인하였다.

녹차엽을 동결 건조하여 분쇄된 시료로부터 폴리코사놀 및 폴리페놀 추출에 대한 초임계 이산화탄소 추출공정은 다음과 같다. 반응기는 내경 2.9cm, 150ml 용량인 고압용 스테인레스 강을 사용 하였고 스테인레스 라인인 1/4 “와 1/8” steel pipe (316ss)를 사용하였다. 액체 이산화탄소로부터 용매를 초임계 압력으로 변환시키는 고압펌프는 51.4 MPa의 용량을 가진 Milton Roy Pump를 사용 하였으며, 이 펌프는 반응기로 유입되는 이산화탄소의 유량을 정량적으로 pumping 하는 역할을 한다. 고압 상태로 반응기에 들어가고 나오는 초임계 이산화탄소의 온도는 digital temperature measuring (Wavetek사 model No : 461-112020)에 의해 측정되었으며 반응기의 압력은 정확도가 높은 Heise Gauge에 의해 측정되었다. 보조용매 pump는 Solvent Delivery Pump (Young-lin scientific Co., model No:930)을 사용하였다. System 내의 압력은 metering valve와 needle valve로 조절하였다. 반응기 내의 충전 된 시료로부터 Oil을 수반하여 반응기로부터 나오는 초임계 이산화탄소의 흐름 공정은 CO₂와 Oil을 분리하는 separator, 압력을 조절하는 metering valve와 needle valve로부터 나오는 유체의 큰 압력 변화로부터 발생하는 열을 제거하기 위한 열 교환기 반응기에 유입되는 초임계 이산화탄소의 사용량을 측정하는 flow meter (Sinagawa 사 model No:DC-2A)로 구성되어 있다.

(2)-2-1-2. 초임계 이산화탄소 추출 장치를 이용한 추출방법

녹차잎으로부터 지용성 추출액을 추출하기 위한 초임계 이산화탄소 추출 장치는 다음과 같다. 추출조는 300mL 용량인 고압용 stainless steel을 사용하였고, 초임계 유체 line은 1/4 “와 1/8 “의 stainless steel pipe (316ss)를 사용하였다. 액체 이산화탄소로부터 용매를 초임계 압력으로 변환시키는 고압펌프 (MiltonRoy)는 추출조로 유입되는 이산화탄소의 유량을 정량적으로 pumping 하였고 보조용매인 ethanol(99%)을 정량적으로 주입시킬 수 있는 보조용매 pump는 Solvent Delivery Pump (Young-lin scientific Co.,modelNo.:930)를 사용하였다. 고압 상태로 추출조에 들어가고 나오는 초임계 이산화탄소의 온도를 측정하는 digital temperature measuring (Wavetek사 model No.:461-112020) 장치를 이용하여 초임계 유체의 온도를 측정하였으며, 추출조의 압력은 초임계유체가 추출조로 들어가는 하단은 digital pressure measuring (Valcom사 model No. : VPRQ-A3-350K-4C) 장치로 초임계 유체가 추출조를 통과하여 나오는 추출조 상단은 Coleparmer gauge로 측정하였다. System내의 압력은 1개의 back pressure regulator valve로 조절하였고 미세한 유량조절은 metering valve로 조절하였다. 이때 급격한 압력차로 인해 유체는 Joule- Thomson Effect (Fachbereich,1999)가 발생하게 되어 pipe가 급냉각 된다. 이를 방지하기 위해 pipe를 원형 항온 수조에 통과하게 하여 유체의 흐름을 원활히 하였다.

(2)-2-1-3. 온도와 압력에 따른 추출물의 변화

초임계 이산화탄소를 이용한 추출에서는 반응기 내부압력 및 온도등의 추출조건에 따라 용매의 용해도가 큰 변수로 작용한다. 따라서 압력은 200, 300, 400, 500 bar에서 온도는 30, 40, 50℃로 변화 시키면서 추출량을 분석하였다. 실험에 사용된 초임계 추출장치는 semi-continuous flow extractor로 추출 탑속에

녹차잎 시료 20g을 증진시킨 후 포화 압력상태인 이산화탄소가 실린더로부터 냉각기 (-15℃)를 통과하면서 이산화탄소 내에 잔존하는 기포가 제거된 후 고압펌프로 의해 시스템 내의 설정 압력까지 일정한 유량으로 유입된다. 고압펌프로부터 추출탑에 유입 되기전에 추출용매로 작용하는 이산화탄소를 설정된 추출온도에 따라 항온조에 의해 예열되고 추출탑 내의 온도는 열 전지에 의해 감지되어 추출온도를 결정 하였다. 초임계 이산화탄소는 추출 탑내의 시료로부터 목적성분을 추출하여 낮은 압력상태로 분리조 내에 유입되어 용제와 용매가 쉽게 분리되었으며이때이산화탄소는추출공정동안사용된건식가스 유량계에 의해 이산화탄소의 양을 측정 한 후 대기로 방출시켰다. 주용매인 이산화탄소는 25mL/min의 유량으로 주입하였고 보조용매는1.0 mL/min 의 유량으로 주입하였다. 반응시간은 전체 60분 trap의온도를 -15℃로 설정하고 추출된 물질은 ethanol (99%, HPLC grade, Aldrich)로 Rinse 하였다.

(2)-2-2. 지용성 녹차 추출물의 정성/정량 분석

(2)-2-2-1. 녹차 추출물에서 폴리페놀 분석

표준용액은 표품 gallic acid (Sigma, U.S.A)을 (ISO)14502-1,2의 방법을 응용하여 1000 ppm의 용액을 조제하여 검량곡선을 얻었다. 추출물의 정량분석을 위해 (ISO)14502-1,2의 방법을 응용하여 분광 광도법에 의한 총 polyphenol을 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 ppm을 제조하여 검량곡선 $Y=1.115x, r^2=0.954$ 을 얻은 후 함량계산에 사용하였다. 시료는 다양한 조건에서 추출된 Oil 0.200 ± 0.001 g을 vial에 넣고 70% 메탄올 5mL를 가한 후 잘 섞어 주었다. 혼합된 샘플을 70℃의 vortex에서 10분간 섞어 준 뒤 실온에서 냉각하였다. 냉각 후 원심분리를 10분간 실행하여 층을 분리한 다음 상층액을 덜어내어 위 과정을 한 번 더 반복하였다. 분리된 상층 액에 70% 메탄올로 최종 부피 10 mL을 맞춘 후 증류수를 이용하여 1/100 농도로 희석하였다. 100배 희석된 샘플 1mL에 Folin-Ciocalteu's reagent를 물로 10배 희석하여 5 mL 첨가한 후 sodium carbonate solution (7.5% v/v) 4mL를 첨가하였다. 혼합된 샘플은 실온에서 60분간 냉각 후 UV/VIS Spectrophotometer를 이용하여 765nm 파장으로 분석하였다.

(2)-2-2-3. 녹차 초임계 추출물의 지용성 비타민 정량

지용성 비타민 정량은 식품공전의 미량 영양성분 시험법 중 고속액체크로마토그래피에 의한 정량방법을 사용하여 수행하였다.

① 비타민 A

시료를 약 6~9 μg을 정밀히 달아 환저플라스크에 취하고, 에탄올 30mL 및 10% 피로칼로에탄올용액 1 mL를 가하여 잘 섞은 후 수산화칼륨용액(9→10) 3mL를 가해 환류 냉각기를 부착하여 실온으로 한 후 물 30mL를 가해 갈색분액깔때기에 옮긴다. 플라스크는 물 10mL로 씻고 이어서 석유 에테르(특급) 30mL로 씻은 후, 씻은 액은 분액깔때기에 합하여 잘 흔들어 혼합하여 방치한 후 물층을 별도의 갈색분액깔때기에 옮겼다. 물층은 석유에테르 30mL씩으로 2회 추출하고, 전 석유에테르추출액을 합하여 물 10mL 1회, 이어 50mL씩으로(페노프탈레인시액으로 정색이 되지 않을 때까지) 씻었다. 분액깔때기중에서 물을 충분히 분리한 석유에테르층을 취하여 무수황산나트륨을 가해 탈수하고 석유에 테르층을 갈색플라스크에 옮겼다. 이어 황산나트륨을 석유에테르 10 mL 씩으로 2회 씻고, Ltt은 색을 앞으 플라스크에 가한 후 석유에테르 추출액을 모두 합하여 40~50℃에서 감압건조한 후 잔류물을 이소프로판올 (특급)으로 녹여 1.0mL로 한 것을 시험용액으로 하였다. 크로마토그래피 분석 조건은 컬럼은 역상컬럼, 이동상은 에탄올:물(95:5), 유속은 0.5mL/분, 검출기는 형광검출기(여기파장 340nm, 측정파장 460nm)로 측정하였다.

또한, 표준용액을 고속액체크로마토그래피로 분석하여 얻은 피크 면적 또는 높이에 의한 검량선을 사용하여 비타민 A의 농도를 구하고 다음 식에 의해 검체중 비타민 A의 함량(I.U/100g)을 산출하였다.

②비타민 E

유지의 약 1g을 정밀히 달아 n-hexane으로 녹여 50mL로 한 후, 그 중 일정량(D mL)을 취해 hexane으로 희석한 것을 시험용액으로 하였다. 컬럼은 순상컬럼, 이동상은 hexan: 이소프로판올(92:8), 유속은 0.5mL/분, 검출기는 형광검출기(여기과장 298nm, 측정과장 325nm)로 측정하였다. 또한 표준용액을 고속액체크로마토그래피로 분석하여 얻은 피크 면적 또는 높이에 의한 검량선을 사용하여 비타민 A의 농도를 구하고 다음 식에 의해 검체중 비타민 E의 함량(mg/100g)을 산출하였다

③비타민 K

검체의 비누화와 추출방법으로 검체 일정량(비타민K, 으로서 3.5 μgkadb)을 정확히 취하여 500mL 분액여두에 넣고 암모니아수 4mL를 가한후 60초간 흔들어 혼합한 후 60mL의 메탄올을 가하고 30초간 혼합한 후 디클로로메탄 100mL와 이소 옥탄 50mL 혼합액을 가하여 잘 흔들어 추출하였다. 층 분리후 하층액을 1,000mL 공전플라스크에 옮긴 다음 다시 디클로로메탄 100mL와 이소옥탄 50mL 혼합액을 가하여 추출한 후 하층액을 합하고 이 액을 75°C 이하에서 감압농축하였다. 공전플라스크를 아세톤 20mL로 씻고 그 액을 농축시키는 조작을 3회 반복한 후 질소 충전하여 차광한 채로 밀봉하였다. 그 후 시험용액의 정제방법은 정제 칼럼에 conditioning 용액 20mL를 주입하고 천천히 용출시켜 그 액을 버린 후 잔류물을 conditioning 용액 100mL로 녹인 후 칼럼에 통과시켜 비타민 K₁ 을 흡착시켰다. 같은 용액으로 5mL 씩 2회에 걸쳐 공전플라스크를 씻고, 씻은 액을 칼럼에 넣은 후 conditioning 용액으로 용출하여 그 액을 버린 다음 검체의 지방 함량에 따라 양을 달리하여 용출용매를 칼럼에 통과시켰다(검체의 지방함량이 0.72~0.80g이면 100mL의 용매를, 0.72g 이하이면 예비실험을 통해 용출액의 양을 결정한다.). 용출액을 250mL 공전플라스크에 받아 75°C 이하에서 감압농축하였다. 이 농축액을 이소옥탄 1~2mL로 몇 회 나누어 씻어 5mL로 정용한 후 사용하였다. 컬럼은 5 μm 실리카가 충전된 250×4.6 mm id의 순상형 칼럼, 이동상은 디클로로메탄과 이소프로판올을 이소옥탄에 30%, 0.02% 녹인 30% 이소옥탄, 검출기는 자외부(UV)검출기(254nm)를 사용하였다. 또한 시험용액 및 표준용액을 각각 20 μL 씩 주입하여 얻은 표준용액의 피크면적 또는 높이에 대한 구한 검량선을 사용하여 검체중 비타민 K₁ (C)의 함량을 구하였다. 2-2-4. 녹차 초임계 추출물의 지용성 카테킨 정량

녹차 초임계 추출물의 지용성 카테킨 함량과 시료6g을 80% Methanol 30mL로 용해한후 Hexane 30mL 용매분획 한 후 각 획분의 용매층을 감압 농축하고 25% acetonitrile으로 용해한 다음 Syringe filter (Whatman, 0.45 μm)로 여과하여 얻은 시료를 각각 HPLC(Waters LC Module I plus) 분석용 시료로 사용하였다.

얻어진 시료의 성분분석은 HPLC를 이용한 동시 분석법을 이용하여 실시하였다. 즉, 아래에 나타낸 바와 같이 처음은 acetonitrile과 50mM H₃ PO₄ 를 6:94의 비율로 용출시키고 이후 29분까지 acetonitrile과 50mM H₃ PO₄ 를 10:90의 비율이 되도록 acetonitrile의 양을 증가시키면서 용출시킨 후 80분까지 acetonitrile과 50mM H₃ PO₄ 를 30:70의 비율이 되도록 용출시켰다. 또한, 13종의 표준 화합물을 HPLC로 분석하여 얻어진 각각의 Peak area면적과 그 절대량으로부터 검량선을 작성하여 함량을 정략하였다.

HPLC condition for analysis of catechins and their derivatives

Item	condition
Instruments	Waters LC Model I plus
Column	zorbax RX-X18 column, 4.6×250mm
Flow rate	0.9 mL/min
Oven temperature	40°C
Wave length	UV 275nm
Mobile Phase	0-27min : 6% Sol. A → 10% Sol. A 29-80min : 10% Sol.

A→30% Sol. A

Solution A : 100% Acetonitrile

Solution B : 50mM H₃ PO₄ (in Distillde Water)

(3). 콜레스테롤 개선 실험 in vitro 연구

(3)-1. HepG2 세포 배양 조건

세포 : HepG2 cell : human hepatocyte cell line

배지 : DMEM 배양액에 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS), 페니실린 (100 U/ml), 스트렙토마이신 (100 µg/ml)을 넣고 pH를 7.0 - 7.2로 조절한다.

배양 환경 : CO₂ 5%, 37°C 배양기에서 배양

세포 분주는 매 72시간 증식 후 실시하고, 계대 배양시에는 PBS (phosphate-buffered saline)로 세척한 후 PBS로 trypsin(10X)을 1X로 희석하여 넣고 처리하여 세포를 탈착시켜 계대 배양한다.

(3)-2. Cell viability 측정

(가). 유리지방산이 Cell viability에 미치는 영향

세포는 96well plate에 1 x 10⁴/well로 24시간 배양하였다. 이 후 포화 유리지방산 palmitic acid의 세포독성을 확인하기 위하여, 시료들을 12, 24시간으로 나누어 처리하였다. EZ-Cytox (Dogen, Korea)을 각 well에 처리하여 1, 2시간 동안 반응시킨 뒤 microplate reader기에서 450nm 파장으로 측정하였다.

(나). 녹차지용성 추출물이 Cell viability에 미치는 영향

세포는 96well plate에 1 x 10⁴/well로 24시간 배양하였다. 녹차 지용성 추출물을 EtOH 또는 DMSO에 각각 희석하여 여러 농도로 처리한 후 24시간 후에 EZ-Cytox (Dogen, Korea)을 각 well에 처리하여 1, 2시간 동안 반응시킨 뒤 microplate reader기에서 450nm 파장으로 측정하였다. 측정결과를 토대로 90%이상의 cell viability를 나타내는 시료의 농도를 세포독성이 없는 농도로 다음 실험진행에 이용하였다.

(3)-3. Leuciferase assay

세포 : HepG2 cell : human hepatocyte cell line

배지 : DMEM 배양액에 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS), 페니실린 (100 U/ml), 스트렙토마이신 (100 µg/ml)을 넣고 pH를 7.0 - 7.2로 조절하였다.

배양 환경 : CO₂ 5%, 37°C 배양기에서 배양하였다.

세포 분주는 매 72시간 증식 후 실시하고, 계대 배양시에는 PBS (phosphate-buffered saline)로 세척한 후 PBS로 trypsin(10X)을 1X로 희석하여 넣고 처리하여 세포를 탈착시켜 계대 배양하였다.

(3)-4. Oil Red O staining

HepG2 cell의 지방축적은 Oil Red O(ORO) staining을 이용하여 측정하였다. 세포를 3.7% Formaldehyde로 10분간 고정시킨 후 60% Isopropanol액으로 세척한다. 다음으로는 ORO working solution(3:2=Stock ORO : distilled water)로 15~20분간 염색하고 난 후 물로 세척하였다. 세포의 staining 정도는 light microscopy를 사용하여 확인하였다.

(3)-5. 녹차추출물이 지방합성에 미치는 효과 규명

- 고지방 세포모델에서 녹차추출물로 인한 세포전체의 지방 함량 시험
- 세포를 harvest하여 전체 지방을 추출

(3)-6. 녹차추출물의 in vitro Cholesterol & Tryglyceride 함량 분석

- 간세포에 녹차추출물 처리 시 세포내 축적된 Cholesterol과 Tryglyceride 중성지방과 콜레스테롤의 함량은 Colorimetric kits (BioVision)를 사용하여 측정하였다. 중성지방 정량은 세포가 배양된 10cm dishes에 1ml 용액 (5%NP-40)을 넣고 균질화시켰다. 100°C 의 Water bath에서 5분동안 열을 가하고 실온에서 식히는 과정을 2번 반복하였다. 그리고 원심분리기로 균질화된 세포들을 다운시키고 상층액을 수집하여 멸균된 물로 희석하였다. 콜레스테롤 정량의 경우에는 세포에 Chloroform/ isopropyl alcohol/ NP-40 으로 추출하고 균질화시켰다. 원심분리기에서 15,000 x g로 10분동안 다운시키고 상층액을 수집하여 vacuum 안에서 30분동안 유기용매들을 날리면서 제거하였다. 건조된 지질은 cholesterol assay buffer로 녹여서 흡광도 570nm에서 측정하였다.

(3)-7. 녹차추출물의 지방합성에 미치는 효과 규명

-Western blot를 이용한 발현 확인

SDS-polyacrylamide gel 전기 영동한 다음 nitrocellulose membrane에 transfer 하여 5% skim milk로 blocking 한 후 여러 가지 1차 항체 및 hrp가 부착된 2차 항체로 반응시키고 ECL 용액을 사용하여 목적 단백질을 확인하였다.

* primary antibody

FAS (Fatty acid synthase)

ACC (Acetyl-Coa carboxylase)

SREBP1c (Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c)

SCD1 (Stearoyl-CoA desaturase)

AMPK (AMP-activated protein kinase) phosphorylation

Sir2/SIRT1 (Silent information Regulator 2)

GLP-1R (glucagon-like peptide 1 receptor)

ABCG1 (ATP-binding cassette) transporter G1

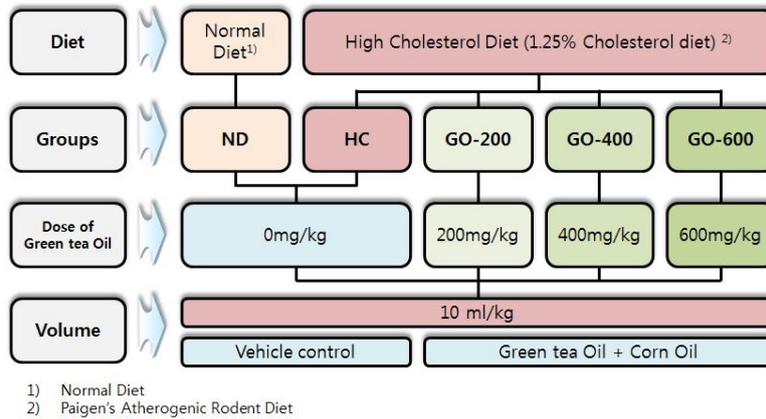
ABCA1 (ATP-binding cassette) transporter A1

ACOX1 (acyl-coenzyme A oxidase1)

(4). 콜레스테롤 개선 시험 in vivo 연구

(4)-1. 실험동물의 사육 및 식이

실험동물은 7주령의 C57BL/6 수컷을 구입하여 처음 1주간 Stock diet로 예비 사육한 후 체중에 따라 난괴법 (completely randomized design)으로 각 군당 12마리씩 5군으로 나누어 4주간 사육한다. 각 실험군은 ① 정상군 ; Normal diet control, ② 음성대조군 ; High cholesterol diet control, ③ 저농도 실험군 ; High cholesterol diet + 녹차지용성 성분(GO) 200mg/kg, ④ 중농도 실험군 ; High cholesterol diet + 녹차지용성 성분(GO) 400mg/kg, ⑤ 고농도 실험군 ; High cholesterol diet + 녹차지용성 성분(GO) 600mg/kg 으로 구성하였고, 녹차지용성 성분은 매일 강제투여한다. 해당 식이와 물은 자유급식법(ad libitum feeding method)으로 사육하며, 사육실의 온도는 22~25°C로 실온을 유지하였고 명암은 12시간 간격으로 점등 및 소등을 한다. 식이섭취량과 체중은 주 1회 간격으로 측정한다.



(4)-2. 시료 채취

4주간의 실험기간 종료 전, 12시간을 절식시키고 Ether로 마취시킨 후 안와 정맥으로부터 혈액 샘플을 수집하여, 1시간 동안 얼음에 보관한다. 혈액은 14000rpm, 4℃, 1min으로 원심분리 한 후, 상층액 (Serum)을 분리하여 실험에 사용하기 전까지 -80℃에 보관한다. 간조직은 적출한 후 PBS (phosphate buffered saline solution) 로 씻어줌으로써 외부물질들을 제거하여 1.5ml Eppendorf tube에 넣어서 실험 전까지 -80℃에 보관한다.

(4)-3. 혈장 지질 농도 분석

혈중 지질상태 개선 측면에서 총 콜레스테롤, 특히 LDL-콜레스테롤과 중성지방 농도가 저하되는 것이 바람직하지만 HDL-콜레스테롤 증가도 매우 중요하다. 총 콜레스테롤 (TC), HDL-콜레스테롤 그리고 중성지방의 성분량분석에는 시판되는 Enzymatic assay kit (ASAN pharmaceutical Co., Seoul, Korea)를 이용하여 분석한다. 총 콜레스테롤과 중성지방 분석에는 혈청 10μl를 사용하였고, HDL-콜레스테롤 분석에는 200μl을 사용하여 진행한다. HDL-콜레스테롤은 분리시액 200μl를 넣고 vortex하여, 10분간 방치한 것을 1000 x g에서 10분간 원심 분리한 후 상층액 50μl를 가지고 분석한다. 각각 Color reagent를 1.5ml씩 넣은 후 37℃ 5~10분 배양하여 발색시켰다. 총 콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤은 500nm에서, 그리고 중성지방은 550nm에서 spectrophotometer 로 흡광도를 측정한다.

LDL-콜레스테롤은 분석을 통해 얻은 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 그리고 중성지방의 수치를 이용하여 계산한다. 계산식은 다음과 같다

$$[\text{LDL-콜레스테롤} = \text{총 콜레스테롤} - (\text{HDL-콜레스테롤} + \text{중성지방}/5)]$$

Apo A1은 HDL-콜레스테롤에서 가장 많이 존재하는 apolipoprotein으로 혈중 HDL-콜레스테롤 형성시에 작용하는 LCAT 활성화에 필수요소이다. Lp(a)는 지질단백질로 콜레스테롤 에스터 및 중성지방으로 구성된 lipid core와 ApolipoproteinB-100 그리고 Apo A1으로 구성되어 있다. 한편, LDL 콜레스테롤 중 단백질의 98%를 Apo B가 차지하고 있으며 동맥경화성 질환에 관련 깊은 LDL의 동태를 반영하는 것으로써 주목 받고 있다. HS-CRP (High sensitivity C-reactive protein)은 고감도 C-반응성 단백질검사는 심혈관계 질환이나 동맥 경화성 질환의 위험도 측정 지표이다.

(4)-4 .Apo A1 측정

Apo A1은 LINCplex Apolipoprotein immunoassay kit(LINCO Research Inc., USA)를 사용하여 측정한다. 표준곡선을 구하기 위한 Apo 1의 농도는 0.61, 3.06, 15.30, 76.48, 382.4, 1,912, 9,560, 47,800 ng/ml이 되게 희석한 다음 10μl 씩 사용한다.

(4)-5. Apo B 측정

APO B Auto· N DAIICHI 시약을 사용하여 측정한다. ApoB와 Anti-mouse Apo B Antibody와 항원항체반응으로 침전시켜 흡광도를 측정한다.

(4)-6. Lp(a)의 측정

Lp(a)농도는 rabbit anti-human Lp(a) r-globulin fraction이 coating된 polystyrene particle로 구성된 Latex Lp(a) Reagent를 이용하여 immunonephelometric assay (Behring Nephelometer II, Dade Behring, Marburg, Germany) 로 측정한다.

(4)-7. Free fatty acid

Half-micro test (로슈, 11 383 175 001) kit를 사용하여 측정한다.

(4)-8. 녹차추출물의 지방합성에 미치는 효과 규명 (Liver, muscle, adipose tissue)

-Western blot를 이용한 발현 확인

간조직은 Lysis buffer을 넣고 homogenizer로 균질화 하여 2시간동안 얼음에 두면서 lysis 시킨다. 15,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 새로운 tube에 저장하였다. Bradford 단백질 정량법 (1976)을 이용하여 각각 30 µg의 sample들을 SDS-PAGE 전기영동을 시킨 후, Nitrocellulose membrane에 transfer한다. Membrane은 5% skim milk에 1시간 동안 차단을 시키고, 각각의 항체 (본 실험에 사용했던 항체들)를 1% skim milk에 1,000배 희석하여 4°C에서 18시간 이상 배양하였다. 그 후, membrane을 0.1% Tween-20/1× TBS에 10분 간격으로 3번 세척 하였고, membrane을 1% skim milk에 5,000배 희석된 horseradish-peroxidase labeled 2차 항체에 1시간 동안 배양한 후, 3번 세척을 거쳐서 Enhanced Chemiluminescent (ECL) 시약을 1분간 처리한 다음 LAS image 기기로 분석한다.

(4)-9. 지방간 예방 효과에 대한 조직학적 변화

- 적절한 간장을 종단으로 자른후 105 중성 완충 포르말린 용액에 48시간 고정후 이 조직을 파라핀 블록을 만들고 헤마톡실린 과 에오진 염색을 시행한후 표본을 광학 현미경으로 관찰한다. 아울러 Oil Red staining을 통해 지방 축적을 확인한다.

* primary antibody

FAS (Fatty acid synthase)

ACC (Acetyl-Coa carboxylase)

SREBP1c (Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c)

SCD1 (Stearoyl-CoA desaturase)

AMPK (AMP-activated protein kinase) phosphorylation

Sir2/SIRT1 (Silent information Regulator 2)

GLP-1R (glucagon-like peptide 1 receptor)

ABCG1 (ATP-binding cassette) transporter G1

ABCA1 (ATP-binding cassette) transporter A1

ACOX1 (acyl-coenzyme A oxidase1)

(4)-10. 통계처리

- 실험 결과의 통계적 처리는 Student's t test 및 Analysis of Variance (ANOVA)로 하며, P-value < 0.05을 유의한 차이의 한계로 하고, 실험결과의 표현은 means ± S.E 로 하였다.

2. 연구 내용 및 결과

2-1. 1차년도

가. 녹차 폴리코사놀 함량 및 조성

녹차잎 제품에 다양한 폴리코사놀이 함유되어 있었다. Mass spectra를 이용하여 폴리코사놀의 종류를 확인하였고, 표준품을 이용하여 R.T.를 비교하여 성분의 동정을 재확인 하였다. 표 1은 보성지역 내 5다원의 녹차제품에 함유된 폴리코사놀의 함량 및 성분조성을 나타낸 것이다. 표 1에서 보는 바와 같이 시중 녹차제품에서도 많은 양의 폴리코사놀이 함유되어 있음을 확인 할 수 있었다. 본 실험결과에 의하면 시중녹차에는 폴리코사놀을 824-1458 mg/kg함유하고 있었다. 이는 이전에 녹차나무에서 채취한 녹차생엽을 건조한 건조엽에 함유된 폴리코사놀함량과 유사하였다. 시중에서 유통되는 녹차제품은 녹차생엽을 덕음 및 건조과정을 거쳐서 제조한 것인데, 이번 연구결과에서는 녹차제품제조 가공과정 중에 폴리코사놀의 손실이 거의 없는 것을 확인하는 결과이다.

Table 1. Contents and compositions of policosanols in commercial green tea products

Policosanols	Green Tea A	Green Tea B	Green Tea C	Green Tea D	Green Tea E
Contents(mg/kg)					
C20-OH	3.68±0.19	0.61±0.08	0.67±0.01	-	1.87±0.15
C22-OH	7.60±0.27	3.72±0.18	4.01±0.07	4.06±0.27	5.12±0.35
C23-OH	1.96±0.42	1.37±0.52	1.71±0.02	1.63±0.04	2.21±0.43
C24-OH	18.22±0.65	19.44±0.32	15.77±0.81	40.03±2.36	23.52±1.26
C25-OH	2.99±0.52	2.32±0.30	3.18±0.07	4.07±0.12	2.80±0.22
C26-OH	84.99±0.66	128.33±1.46	104.11±4.50	259.18±12.18	146.40±6.31
C27-OH	7.23±1.10	7.13±1.61	8.74±0.10	10.15±0.32	6.63±0.18
C28-OH	315.80±9.79	335.20±4.45	451.25±25.14	589.19±22.17	496.85±23.42
C29-OH	11.84±1.45	6.66±0.30	16.97±0.75	13.74±0.22	11.64±0.71
C30-OH	452.11±39.31	250.98±2.53	615.72±45.19	348.52±10.45	521.58±24.85
C32-OH	168.05±14.30	68.78±1.86	235.95±17.54	52.42±1.65	146.67±6.05
Total	1074.46±68.66	824.55±6.07	1458.09±94.14	1322.98±49.05	1365.30±60.41
Composition (%)					
C20-OH	0.3	0.1	0.1	0.0	0.1
C22-OH	0.7	0.5	0.3	0.3	0.4
C23-OH	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2
C24-OH	1.7	2.4	1.1	3.0	1.7
C25-OH	0.3	0.3	0.2	0.3	0.2
C26-OH	7.9	15.6	7.1	19.6	10.7
C27-OH	0.7	0.9	0.6	0.8	0.5
C28-OH	29.4	40.7	31.0	44.5	36.4
C29-OH	1.1	0.8	1.2	1.0	0.9
C30-OH	42.0	30.4	42.2	26.3	38.2
C32-OH	15.6	8.3	16.2	4.0	10.7

나. 녹차잎의 수용성 물질 제거(우리기) 후 녹차의 폴리코사놀 함량 및 조성에 미치는 영향

표 2는 녹차제품을 우려낸 전후의 폴리코사놀 함량 및 조성을 비교한 결과이다. 이번 결과에 의하면 녹차를 우려내는 과정에서도 폴리코사놀의 손실이 전혀 없음을 확인할 수 있었다. 오히려 녹차를 우려내고 난 녹차찌꺼기에서 우려내기전의 녹차제품에 비하여 약 20%정도의 폴리코사놀함량이 증가하였다. 녹차를 우려내기 전과 후의 제품에 함유된 폴리코사놀 함량은 각각 1365 및 1683 mg/kg이었다. 그러나 성분의 조성에는 녹차를 우려내기 전과 후의 경우에 큰 차이를 보이지 않았다. 녹차를 우려내고 난 후에도 녹차제품에 상당량의 폴리코사놀이 함유되어 있다는 사실은 경제적인 관점에서 볼 때 매우 중요한 발견이라고 할 수 있다. 왜냐하면, 캔 및 보틀 녹차음료산업에서는 녹차음료를 가공하고 남은 녹차찌꺼기는 폐기용 혹은 비료등의 저부가가치 용도로 사용될 수 밖에 없었는데, 기능성성분이 폴리코사놀의 중요한 자원으로 재활용 가능성을 나타낸 것이기 때문이다.

Table 2. Contents and compositions of policosanols in a commercial green tea product before and after infusion with hot water

Policosanols	Green Tea E	
	Before Infusion	After Infusion
Contents(mg/kg)		
C20-OH	1.87±0.15	2.51±0.69
C22-OH	5.12±0.35	6.38±0.49
C23-OH	2.21±0.43	2.11±0.25
C24-OH	23.52±1.26	28.37±0.75
C25-OH	2.80±0.22	2.72±0.19
C26-OH	146.40±6.31	184.27±1.40
C27-OH	6.63±0.18	8.30±1.27
C28-OH	496.85±23.42	630.13±4.72
C29-OH	11.64±0.71	10.22±3.01
C30-OH	521.58±24.85	638.71±0.42
C32-OH	146.67±6.05	170.19±1.13
Total	1365.30±60.41	1683.90±0.45
Composition (%)		
C20-OH	0.1	0.1
C22-OH	0.4	0.4
C23-OH	0.2	0.1
C24-OH	1.7	1.7
C25-OH	0.2	0.2
C26-OH	10.7	10.9
C27-OH	0.5	0.5
C28-OH	36.4	37.4
C29-OH	0.9	0.6
C30-OH	38.2	37.9
C32-OH	10.7	10.1

다. 추출방법에 따른 차엽추출물의 성분조성 및 함량

(1). 차엽으로부터 hexane을 이용한 지용성 성분 추출

표 3 및 4은 각각 건조 차엽을 hexane으로 추출한 추출물중의 피토스테롤, 및 토코페롤 함량 및 조성을 나타낸 것이다. 건조차엽 hexane추출물중에 함유된 피토스테롤, 및 토코페롤함량은 각각 5554.21, 6495.04 mg/kg 이었다. 이결과는 hexane추출물의 주성분이 폴리코사놀임을 확인하는 결과이었다. hexane추출물중의 폴리코사놀함량은 3.2g/100g으로 백분율로는 3.2%에 달하였다.

Table 3. 건조차엽의 hexane 추출물에 함유된 피토스테롤 함량 및 조성

	β -Sitosterol	Campesterol	Stigmasterol
Hexane 추출물	5554.21 \pm 368.67	-	-

Table 4. 건조차엽의 hexane 추출물에 함유된 토코페롤 함량 및 조성

	α -Tocopherol	β -Tocopherol	γ -Tocopherol	δ -Tocopherol
Hexane 추출물	6495.04 \pm 988.86	-	-	-

(2). 차엽으로부터 초임계 이산화탄소 유체 추출장치를 이용한 지용성 성분 추출

(가). 초임계 유체 추출시험

표 5 및 6은 각각 건조 차엽을 초임계유체추출장치를 이용하여 얻은 추출물중의 피토스테롤, 및 토코페롤 함량 및 조성을 나타낸 것이다. 건조차엽 초임계추출물중에 함유된 피토스테롤, 및 토코페롤함량은 각각 2435 - 2933, 및 1447 - 3280 mg/kg 이었다. 이 결과에서도 초임계 추출장치를 이용하여 얻은 추출물에 함유된 피토스테롤 및 토코페롤함량이 hexane추출물의 그것들과 비교하여 매우 적은 값들임을 확인하였다. 이는 초임계추출장치를 이용할 경우 이러한 성분들의 추출이 매우 어렵다는 것을 나타낸 것이다. 초임계추출장치를 통하여 추출물을 수거하는 과정에 추출조에 넣은 시료량에 비하여 얻어지는 추출물의 양이 극도로 적어서 추출조의 출구부분의 튜빙 및 추출조내부에 추출물이 엉겨붙어 효율적인 회수가 상당히 어려운 것으로 판단되었다.

Table 5. 건조차엽의 추출조 압력을 달리하여 얻은 초임계유체추출물에 함유된 피토스테롤 함량

	β -Sitosterol	Campesterol	Stigmasterol
400bar - 120min	2435.38 \pm 116.61	-	-
450bar - 120min	2933.15 \pm 246.92	-	-
500bar - 120min	2449.99 \pm 139.88	-	-

Table 6. 건조차엽의 추출조 압력을 달리하여 얻은 초임계유체추출물에 함유된 토코페롤 함량

	α -Tocopherol	β -Tocopherol	γ -Tocopherol	δ -Tocopherol
400bar - 120min	1447.56 \pm 314.85	-	-	-
450bar - 120min	3280.70 \pm 179.72	-	-	-
500bar - 120min	1663.45 \pm 229.95	-	-	-

표 7 및 8은 각각 건조 차엽을 보조용매 사용여부에 따른 초임계유체추출물중의 피토스테롤, 및 토코페롤 함량을 나타낸 것이다. 보조용매를 사용하지 않고 얻은 건조차엽 초임계추출물중에 함유된 피토스테롤, 및 토코페롤함량은 각각 5492, 및 2429 mg/kg 이었다. 그러나 에탄올을 보조용매를 사용하여 얻은 초임계추출물중에 함유된 피토스테롤 및 토코페롤함량은 각각 3791, 및 8369 mg/kg 이었다. 이 결과에서도 초임계 추출시 보조용매 사용여부에 따라 얻어진 추출물중의 피토스테롤 및 토코페롤함량도 매우 다르다는 것을 나타낸 것이다. 토코페롤의 경우에는 보조용매를 사용한 경우에 약 3.5배정도 높은 값을 나타내어, 보조용매 사용 시 매우 높은 토코페롤 추출효율을 확인할 수 있었다.

Table 7. 건조차엽의 보조용매(에탄올)사용 여부에 따른 초임계유체추출물에 함유된 피토스테롤 함량

	β -Sitosterol	Campesterol	Stigmaterol
400bar - 90min	3791.37 \pm 259.48	-	-
400bar - 120min	5492.86 \pm 76	-	-

Table 8. 건조차엽의 보조용매(에탄올)사용 여부에 따른 초임계유체추출물에 함유된 토코페롤 함량

	α -Tocopherol	β -Tocopherol	γ -Tocopherol	δ -Tocopherol
400bar - 90min	8369.71 \pm 48.16	-	-	-
400bar -120min	2429.00 \pm 360.47	-	-	-

(3). 차엽으로부터 식용유를 이용한 지용성 성분 추출

표 9 및 10은 각각 건조 차엽 식용유 추출물중의 피토스테롤, 및 토코페롤 함량을 나타낸 것이다. 보조용매를 사용하지 않고 얻은 건조차엽 초임계추출물중에 함유된 피토스테롤, 및 토코페롤함량은 각각 513 및 45 mg/kg 이었다. 이 결과에서도 식용유 추출시 초임계유체 추출, 헥산추출 등의 기타 방법에 비하여 피토스테롤 및 토코페롤함량이 매우 낮은 것을 나타낸 것이다.

Table 9. 건조차엽의 식용유를 이용한 추출물에 함유된 피토스테롤 함량

	β -Sitosterol	Campesterol	Stigmaterol
식용유 추출물	514.33 \pm 36.02	-	-

Table 10. 건조차엽의 식용유를 이용한 추출물에 함유된 토코페롤 함량

	α -Tocopherol	β -Tocopherol	γ -Tocopherol	δ -Tocopherol
식용유 추출물	45.68 \pm 23.61	-	-	-

라. 초임계 지용성 녹차 추출물의 벤조피렌 함량 분석 및 벤조피렌 저감화 공정 수립

(1). 녹차 초임계 추출물 제조

초임계유체 추출장치는 추출조, 분리조, 가압펌프로 구성되어 있으며, 녹차 1 kg을 추출조(HA 630-40-150, China)에 채우고, 추출온도는 50°C, 압력을 30 MPa로 온도조절기와 가압펌프를 조절한 후 추출조건에 이르면 초임계유체인 CO₂ (SCF-CO₂) 100 mL와 co-solvent 100 mL를 연속적으로 통과시켜 주면서 150분 동안 추출하여 녹차 초임계 추출물을 제조하였다.

(2). 흡착제

벤조피렌을 효과적으로 흡착하기 위하여 흡착제로 순황토, 맨반석, 제올라이트, 활성탄, 건운모(세리사이드), 백토등을 각각 0.1%, 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%까지 첨가하여 흡착력을 확인하였다. 최적조건 확립을 위하여 가열온도 및 가열 시간을 실온 (20°C)과 80±5°C로 가열하였으며, 가열시간은 24시간이 교반한 후에 각각 채취하여 분석시료의 벤조피렌 함량을 확인하였다.

(3). 실험 재료

녹차 초임계추출물은 보성녹차영농조합으로부터 공급받았으며, 일반 식용유는 시중에서 생산 유통되고 있는 식용유 (대두유, 옥수수유, 채종유, 포도씨유, 올리브유)를 구입하였다. 정량분석을 위한 표준물질인 벤조피렌과 내부표준물질인 3-메틸콜란트렌(3-methylcholanthrene)은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 조제 및 회석하여 사용하였다. n-Hexane, dichloromethane, N,N-dimethylformamide (DMF), acetonitrile 등은 HPLC용 또는 잔류농약용으로 Merck사 (Darmstadt, Germany)에서 구입하였고, sodium sulfide nonhydrate는 Sigma-Aldrich Chemical Co.에서 구입하였다. 또한 Sep-Pak Florisil Vac Cartridge 3 cc/500mg(Waters, MA, USA)를 사용하였다.

(4). 녹차유의 벤조피렌 함량 분석

시료 중 벤조피렌 추출 및 정제 조건은 벤조피렌 시험법을 수정 보완하여 실시하였다. 비이커에 10 g의 시료를 칭량하여 넣고 내부표준용액을 첨가하고 n-hexane 100mL에 녹여 분액깔때기(I)에 옮겨 완전히 용해시킨다. 분액깔때기(I)에 50mL의 90%(v/v) DMF를 넣어 흔들어 섞은 후 정치하고 DMF층을 분리하여 분액깔때기(II)에 옮긴다. n-Hexane 층에 90% DMF 25mL를 넣고 위와 동일한 방법으로 2회 되풀이하여 DMF 층을 분액깔때기(II)에 합친다. 모아진 DMF층에 1%(w/v) sodium sulfate 용액 100mL과 n-hexane 50mL를 넣어 흔들어 섞은 후 처어치하여 n-hexane층을 분액깔때기(III)에 옮긴다.

90% DMF 35mL을 분액깔때기(II)에 넣고 위와 동일한 방법으로 2회 되풀이 하여 n-hexane층을 분액깔때기(III)에 회수한 후, 증류수로 2회 세척하였다. n-hexane층에 무수황산나트륨 15g을 넣은 후 Whatman IPS 여과지로 탈수 여과하고 회전감압농축기(40°C, 수욕상, BUCHI R-124, BUCHI, Flawil, Switzerland)를 사용하여 농축하였다. Sep-Pak Florisil cartridge에 시료 농축액을 1 mL/min의 속도로 가한 후 n-hexane 5mL와 n-hexane/dichloromethane (3:1, v/v) 15mL로 각각 용출시킨 후 이 용출액을 40°C 이하의 수욕상에서 질소 가스로 휘발시킨 후 잔류물을 acetonitrile로 녹여 전량을 1mL로 하고 이를 0.45 μm membrane filter로 여과하여 시험용액으로 사용하였다. 벤조피렌 함량은 HPLC(Shimazu, Kyoto, Japan)로 분석하였다. 사용한 column은 Supelcosil LC-PAH(25cm X 4.6mm, Supelcosil, USA) 이었고 fluorescence detector (Shmazu, Kyoto, Japan)를 사용하여 여기파장 294 nm, 형광파장 404nm(Ex/Em)에서 분석하였으며, 이동상은 80% acetonitrile, 유속은 1.0mL/min 이었다.

Table 10. HPLC conditions for analysis of gallic acid, catechins and theaflavins in Green tea leaves oil from SFE.

	Condition
Instruments	Waters LC Model I plus
Column	Zorbax RX-C18 column, 4.6×250 mm
Flow rate	0.9 mL/min
Oven temperature	40 °C
Wavelength	UV 275 nm
Mobile Phase	0-27 min : 6% Sol. A → 10% Sol. A 27-80 min : 10% Sol. A → 30% Sol. A solution A : 100% acetonitrile solution B : 50 mM H3PO4 (in distilled water)

(5). 벤조피렌의 함량 분석

검량선 작성을 위하여 0.5 - 30.0 ppb 범위의 5개 농도에서 측정 분석한 결과 $Y = 1.2475X - 0.0475$ 의 검량선을 나타냈으며 0.999 이상의 높은 상관계수를 나타냈다. 검출한계(LOD)는 0.014 ppb로 산출되었다. 정량한계(LOQ)는 0.043 ppb로 산출되었다.

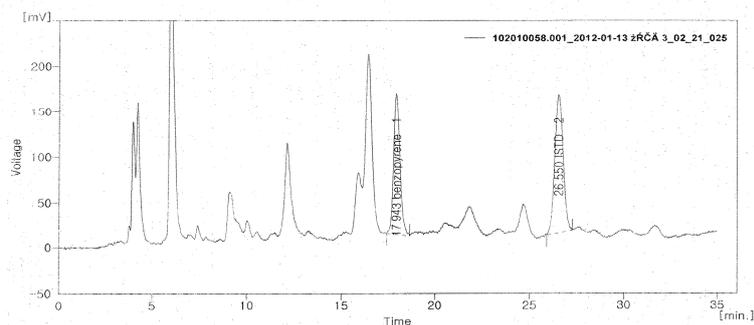


Fig. 1. Chromatograph of benzo(a)pyren in Green tea leaves oil from SFE.

(6). 원재료의 벤조피렌 함량

본 연구에서 측정된 초임계추출 녹차유 원액과 시중에 판매되는 식용유들의 벤조피렌 함량을 확인하였다(Table 11). 초임계 추출한 녹차유 원액의 경우는 벤조피렌 함량이 62.54 - 58.72 ppb로 상당히 많이 검출되었다. 이에 반해 시판되는 대두의 경우는 벤조피렌의 함량이 0.51 ppb로 매우 적게 나타났으며, 옥수수유의 원재료인 옥수수 배아의 경우는 벤조피렌의 함량은 1.37 ppb로 검출되었다.

초임계 추출한 녹차유의 벤조피렌 함량이 높은 원인은, 녹차 생엽을 건조하지 않으면 생엽이 발효가 진행되어 상품성이 떨어지기 때문에 빠른 시간에 건조하는 과정을 거쳐 5% 미만의 수분 함량에서 보관해야 하기 때문이다. 이때 열풍에 의한 변성으로 인하여 벤조피렌의 함량에 크게 영향을 받는 것으로 추정되었다. 또한 초임계 추출을 위한 녹차 생잎 원료의 수분함량은 대략 5% 이내로서, 보관이 용이하고 수분함량이 적어야 초임계 추출 시 수율이 향상되기 때문이다.

Table 11. Benzo(a)pyrene contents of raw materials

Samples	Benzo(a)pyrene contents (ppb)
Green Tea Oil	60.25±0.14
Soybean	0.51±0.14
Corn germ Oil	1.37±0.79

(7). 흡착제를 이용한 여과법에 의한 벤조피렌 저감화

일반적으로 추출 원유형태를 부분 정제유(refined oil)의 형태로 제조한 후 탈산, 탈색, 탈취 등의 정제과정을 거치며, 그 다음은 분획 (Fractionation)과정으로, 특정 온도에서 고체상의 물질을 제거하는 과정이다. 가장 널리 사용되는 방법은 결정화(crystalization)를 통한 분획방법으로 특정온도에서 녹는점이 다른 물질을 분리하는 방법이며, 그 중에서 “Dry fractionation” 으로 자주 사용되어지는 방법이 Winterization 방법이다. Winterization 방법은 냉장온도에서 현탁액이 생기는것을 방지하기 위하여 식용유로부터 소량의 결정화 물질을 여과법을 이용하여 제거하는 방법이다.

본 연구에서 사용한 여과장치는 Whatman No.1을 이용한 필터링을 사용하였으며, 녹차유 원액의 점도가 1,800 Cpoise 이상으로 높아 Membrane/filter 장치는 사용할 수 없었다. 본 연구에서는 초임계 추출한 녹차유 원액을 냉장온도(-1℃~3℃)에서 24시간 보관하였다가 여과장치를 통하여 정제하여 시료를 채취하여 벤조피렌 함량을 확인하였다.

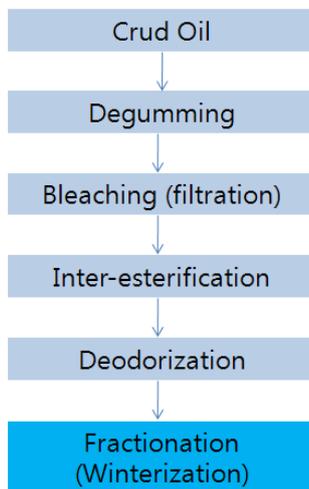


Fig.2. Diagram of benzopyrene reduction process by filtration

녹차유 원액의 벤조피렌 함량은 62.5423 ppm을 보였으나, winterization 공정을 거친 후, 벤조피렌 함량이 18.8831 ppm으로 낮추어 검출되었다. 이는 녹차 원유 내 왁스물질이 온도에 의하여 결정화 되면서 일부 벤조피렌 성분이 제거된 것으로 추정된다. Winterization 공정을 통하여 60% 이상의 벤조피렌 저감 효과를 확인할 수 있었으며, 수율 손실은 약 10%정도 감소하는 경향을 보였다.

녹차유 내에 함유된 벤조피렌을 저감화하기 위하여 흡착제를 이용하여 벤조피렌 저감화를 실시하였다. 우선 흡착력이 우수하다고 알려진 순황토, 맥반석, 제올라이트, 활성탄, 견운모(세리사이드), 백토등을 구입하여 흡착제의 농도(%), 가열 온도(℃) 및 가열 시간(hr)이 녹차유 내에 함유된 벤조피렌의 저감화에 영향을 미치는 주요 인자임을 확인하여 독립변수로 설정하였다. 최적조건 확립을 위하여 흡착제 농도를 각각 0.1%, 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%까지 첨가하여 흡착력을 확인하였으며, 가열온도 및 가열 시간을 실온(20℃)과 80±5℃로 가열하였으며, 가열시간은 24시간 동안 교반한 후, 원심분리하여 상등액을 각각 채취하여 분석시료의 벤조피렌 함량을 확인하였다.

Table 4에 각 흡착제 농도별, 가열시간 및 가열시간에 따른 벤조피렌 함량을 보여주고 있다. 모든 흡착제의 경우 첨가량의 증가에 따라 벤조피렌 함량이 낮아지는 경향을 보였다. 가열온도를 80±5℃에서 24시간 교반하여 원심분리한 경우 벤조피렌 함량의 감소가 두드러지게 확인되었다.

Table 12. Experimental values of benzo(a)pyrene contents (ppm) determined from 6 different absorbent materials with/without heat treatment for 24h.

	Treatment	Concentration (%)				
		0.1	0.5	1.0	1.5	2.0
순황토	20±5℃	16.24	12.25	8.24	5.15	3.24
	80±5℃	13.25	8.21	4.12	1.20	0.82
맥반석	20±5℃	17.36	15.32	12.54	10.25	8.22
	80±5℃	15.24	12.35	9.35	6.16	4.22
제올라이트	20±5℃	15.21	12.35	9.24	6.24	4.52
	80±5℃	13.24	9.25	4.35	1.54	0.92
활성탄	20±5℃	16.85	11.59	7.21	4.22	2.86
	80±5℃	13.41	7.22	3.21	1.35	0.51
견운모	20±5℃	18.21	16.33	11.55	8.22	6.35
	80±5℃	15.23	12.26	9.25	6.53	4.13
백토	20±5℃	17.62	13.33	9.15	6.73	4.26
	80±5℃	15.21	10.33	7.46	4.54	2.02
*광물혼합물	20±5℃	16.12	11.34	8.15	5.22	2.84
	80±5℃	14.28	6.45	2.62	0.76	0.02

*광물혼합물 : 순황토+제올라이트+활성탄+백토 혼합물

순황토의 경우 2.0% 첨가 시에 20℃에서 처리한 녹차유 샘플은 3.2418 ppm 까지 감소되었으며, 80±5℃에서 처리한 녹차유 샘플은 벤조피렌 함량이 0.8214 ppm 까지 감소하였다. 활성탄 2.0% 첨가 시 20℃에서 처리한 녹차유 샘플은 2.8643 ppm 까지 감소되었으며, 80±5℃에서 처리한 샘플은 벤조피렌 함량이 0.5142 ppm 까지 현저하게 감소하였다. 실험에 사용한 흡착제 중 활성탄>순황토>제올라이트>백토 순으로 벤조피렌 함량 감소 추세를 보였다. 이들 4가지 광물의 혼합물을 첨가 하였을 경우는, 벤조피렌 함량이 0.0215 ppm 을 저감됨으로써 목표치인 2 ppb 이하로 벤조피렌 함량을 제거 하였다. 벤조피렌의 잔존량에 대하여 가열온도와 가열시간보다는 흡착제의 농도가 가장 유의적인 영향을 나타내었지만, 녹차유 원액의 벤조피렌 함량 2 ppb 이하를 유지하기 위하여 가열온도 80±5℃에서 24시간 반응 하는것이 최적 조건으로 적합하다.

2-2. 2차년도

가. 초임계 이산화탄소의 온도와 압력에 따른 추출물의 변화

재료 및 방법에서 기술 하였듯이 초임계 이산화탄소를 이용한 추출에서는 반응기 내부압력 및 온도등의 추출조건에 따라 용매의 용해도가 크게 변하기 때문에 가장 적절한 추출조건을 조사하기 위하여 압력은 100, 200, 300, 400 bar에서 온도는 30, 40, 50℃로 변화 시키면서 추출량을 분석하였다. 주용매인 이산화탄소는 25 mL/min 의 유량으로 주입하였고, 보조용매는 1.0mL/min 의 유량으로 주입하였다. 반응시간은 전체 60분 trap의 온도를 -15℃로 설정하고 추출된 물질은 ethanol (99%,HPLC grade, Aldrich)로 Rinse 하였다. 그 결과, 200 bar에서는 온도조건을 달리하여도 추출되는 polyphenol의 양에는 큰 변화가 없었고 압력을 300bar로 올렸을 때에도 기본적인 추출양은 늘었지만 온도에 따른 변화는 관찰되지 않았다. 하지만 400bar에서는 추출 절대량에 있어서 그 보다 낮은 압력에 비해 많아졌고 특히, 400 bar에서는 추출양이 최고치에 달했다. 하지만 그 보다 더 높은 압력인 500 bar에서는 오히려 추출양이 400 bar에 비해 줄었지만 온도가 높아지는 양상에 따라서 추출량이 현저하게 증가하는 양상을 보이고 있었다. 따라서 400 bar에서 더 높은 온도조건으로 추출을 시도하는 실험을 구상해 볼 필요를 느끼는 부분이다.

결론적으로 녹차잎으로 부터 추출한 Polyphenol은 400bar, 50℃ 조건에서 가장 높은 추출률을 보였다.

Table 2. Polyphenol component analysis of supercritical fluid extraction method from tea leaves.

unit:ug/g

	200bar	300bar	400bar	500bar
30℃	228.0	413.4	829.3	452.3
40℃	220.0	440.4	1039.6	733.8
50℃	213.0	439.1	1071.5	905.7

나. 녹차 초임계 추출물의 총 폴리페놀 측정

(1). 녹차 초임계 추출물의 총 폴리페놀 측정 결과

본 실험에서는 실험구인 녹차 초임계추출물에 함유되어 있는 Total phenolic compounds 함량을 분석하였다. 그 결과 (표1-1), 녹차 초임계추출물에 많은 phenol 화합물을 함유하고 있음이 확인되었다.

표 2-1. 녹차 초임계추출물의 총 폴리페놀 함량

Sample	content (mg/g)
Green Tea SFE Extract	2.47

(2). 녹차 초임계 추출물의 지용성비타민 정량 결과

초임계 추출에 의하여 용출 가능성이 높은 지용성 비타민인 비타민 A, 비타민 E, 비타민 K의 함량을 측정하였다.(표2-3). 비타민 A의 경우는 비타민 A의 함량과 함께 자연계에 존재하는 전구체 형태(프로비타민 A)인 카로틴의 함량을 동시에 측정하였다. 보통 비타민 A라고 불리는 것은 A₁ 을 가리키며 레티놀 (retinol)이라는 화학명을 가지고 있으며 비타민 A는 식물에서는 발견되지 않으며, 식물은 카로틴(α -, β -, γ -carotene)이라고 하는 황색 또는 주황색 물질을 스스로 합성할 수 있는데 이들은 쉽게 비타민 A로 전환되어 동물 체내에서 이용되기 때문에 프로비타민 A이라고 불린다. 비타민 A는 측정결과 대두유와 초임계 녹차추출물 모두에서 검출되지 않았고 베타카로틴은 녹차 추출물에서만 4.131mg/100g의 함량이 검출되었다.

비타민 K(나프토크논)는 기름에 용해되고 혈액응고에 필수적인 지용성 비타민으로 빛, 알칼리에 불안정하고 열에는 안정하다. 비타민 K의 측정결과, 녹차 추출물에 대두유의 약 120배 높은 1.843mg/100g의 비타민 K가 함유되어 있음이 확인되었다.

또한 항산화효과가 뛰어나다고 알려진 비타민E(토코페롤)의 함량을 조사한 결과 kshrck 추출물이 대두유보다 약 3배정도 높은 537.9mg/100g의 비타민 E를 함유하고 있음이 나타났다.

표 2-2. 녹차 초임계추출물의 지용성 비타민 함량

Items	Green Tea SFE Extract
Vit. A(mg/100g)	N.D
Vit. E(mg/100g)	537.9
Vit. K(mg/100g)	1.843

N.D : not detected

(3). 녹차 초임계 추출물의 카테킨 분석

녹차의 기능성은 대부분 성분 중 카테킨류가 기인한다고 알려져 있다. 카테킨류는 폴리페놀류의 일종으로 항산화, 항암, 해독, 혈당저하, 항균, 증치예방효과 및 노화억제 작용 등을 한다고 보고되어 있으며 (-)epicatechin (EC), (-)epigallocatechin (EGC), (-) epicatechin-3-gallate (ECG), (-)epigallocatechin-3-gallate (EGCG)의 4종 주성분 외에 (-)gallocatechin gallate(GCG), (-)catechin gallate (CG), (+)catechin(C) 등 수 종류가 존재한다.

주요 카테킨류 중 EGC는 강한 항산화력이 있으며, EGCG는 항암 및 항염증 작용에 매우 높은 생리활성을 나타낸다고 보고되어있다. 초임계 녹차추출물과 녹차를 80% MeOH에 추출하여 HPLC로 카테킨류의 함량을 분석, 비교한 결과(표2-3), 초임계 녹차추출물의 카테킨류의 함량이 모두 미량이지만 그 중 ECG가 가장 많은 양이 검출되었다. 녹차에 비하여 미량으로 나타나 녹차로부터 초임계 추출을 통하여 용출되는 카테킨의 양은 그리 많지 않음을 알 수 있었다. 또한 카테킨의 산화물의 일종으로 알려진 Theaflavin류를 분석한 결과 초임계 녹차 추출물에 미량이지만 이들의 존재로 확인할 수 있었다.

표 2-3. catechins, theaflavins, proctanidines과 caffeine의 함량

contents (%)	sample	
	80% MeOH extract of green tea SFE extract.	80% MeOH extract of green tea ^{1) 9)}
G	49.48	*
EG	N.D.	41.48
PRB1	N.D.	*
C	0.59	*
Ca	22.62	*
EC	N.D.	8.30
EGCG	2.73	45.10
ECG	7.76	5.12
PRC1	12.90	*
TF	1.15	N.D.
TF3G	2.11	N.D.
TF3'G	N.D.	N.D.
TF3,3'DG	0.66	N.D.
Total	100.00	100.00

N.D. : not detected

* : 분석하지 시료

abbreviation

G : Gallic acid, EGC : (-)epigallocatechin,

PR B1 : Procyanidin B1, C : Catechin, Ca : Caffeine,

EC : (-)epicatechin, EGCG : (-)epigallocatechin 3-O-gallate,

PR C1 : Procyanidin C1, ECG : (-)epicatechin 3-O-gallate,

TF : Theaflavin, TF3G : Theaflavin-3-O-gallate,

TF3'G : Theaflavin-3'-O-gallate,

TF3,3'DG : Theaflavin-3,3'-Ogallate

(4). 녹차 초임계 추출의 잔사물 분석

녹차는 G, EGC, PR B, C, Ca, EC, EGCG, PR C1, ECG, TF, TF3G, TF3'G ,TF3,3'DG으로 총 13종이 나왔고 표 2-4에 나타낸 바와 같이 G는 3.7mg/g, EG는 16.1mg/g, PR B는 0.1mg/g, C는 0.4mg/g, Ca은 12.2mg/g, EC는 3.9mg/g, EGCG는 35.6mg/g, PR C1는 25.0mg/g, ECG는 10.1mg/g, TF는 0.3mg/g, TF3G는 0.1mg/g, TF3'G는 0.1mg/g, TF3,3'DG는 0.1mg/g로 EGCG> PR C1> EGC> Ca> ECG> EC> G> C> TF> TF3G, TF3'G ,TF3,3'DG, PR B 순으로 분석 된 반면 녹차 초임계 추출 잔사물은 ECG, Ca, PR B, EGCG, ECG, TF가 나왔다. 표 2-6에 나타낸 바와 같이 EGC는 73.24mg/g, Ca은 43.70mg/g, PR B은 8.72mg/g, EGCG은 187.8mg/g, ECG은 42.21mg/g, TF은 4.48mg/g로 EGCG> EGC> Ca> ECG> PR B> TF순으로 분석되었다.

표 2-4. 녹차와 녹차초임계 추출 잔사물 분석

sample	Contents													합계
	G	EGC	PR B	C	Ca	EC	EGCG	PRC I	ECG	TF	TF3 G	TF3, 3'D DG	TF3, 3'D G	
녹차	3.7	16.1	0.1	0.4	12.2	3.9	35.6	25.0	10.1	0.3	0.1	0.1	0.1	107.7
구성비	3.4	14.9	0.09	0.3	11.3	3.6	33.1	23.2	9.3	0.2	0.1	0.1	0.1	100
보성녹차 초임계 추출잔사	-	73.2	8.7	-	43.7	-	178.8	-	42.2	4.4	-	-	-	351
구성비	-	20.9	2.5	-	12.5	0.0	50.9	-	12.0	1.3	-	-	-	100.0

abbreviation G : Gallic acid, EGC : (-)-epigallocaatechin, PR B1 : Procyanidin B1,C : Catechin, Ca : Caffeine, EC : (-)-epicatechin, EGCG : (-)-epigallocatechin 3-O-gallate, PR C1 : Procyanidin C1, ECG : (-)-epicatechin 3-O-gallate, TF : Theaflavin, TF3G : Theaflavin-3-O-gallate, TF3'G : Theaflavin-3'-O-gallate, TF3,3'DG : Theaflavin-3,3'-Ogallate

다. 녹차엽 초임계추출 지용성물질 생산 공정 표준화 매뉴얼 작성

- 식품의 종류 : 녹차 초임계 추출액 (지용성 물질)
- Manufacture Processing (제조과정 및 방법) -2018년 6월 시행

Material & Tools

- ▷ 재료: 녹차 생엽
- ▷ 기기: 건조기, 초임계유체 CO2를 사용하여 초임계 추출기

*** 녹차엽 초임계추출 지용성물질 생산 제조공정 ***

	공 정	세 부 사 항
1	다원 (녹차발) 채취	<input type="checkbox"/> 잎의 색상, 모양, 잎의 크기, 선명도를 확인하여 생잎 채취 및 선별 <input type="checkbox"/> 이 물질 (고잎, 줄기)등을 선별하여 제거한다.

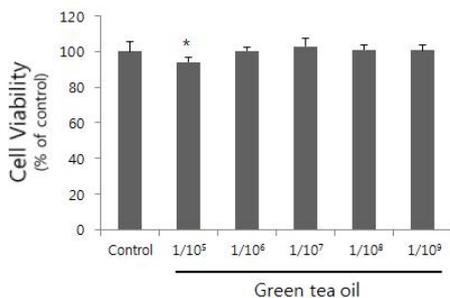
2	급열 및 냉각 공정	<input type="checkbox"/> 선별된 원료를 60℃~ 65℃의 물에 침지하여 5분간 데친 후, 냉각기에서 공랭식 환풍기로 냉각
3	유념 공정	<input type="checkbox"/> 유념기(S-120)에서 녹차엽의 건조를 원활히 하도록 20분간 피막층을 벗기는 유념 공정을 거친다.
4	건조 공정	<input type="checkbox"/> 건조온도 60±1℃, 건조 시간 3 hr <input type="checkbox"/> 강제 송풍식 건조기를 이용하여 서서히 건조한다.
5	분쇄 공정	<input type="checkbox"/> 초임계추출을 위하여 건조한 녹차잎을 분쇄한다.
6	유지 첨가	<input type="checkbox"/> 차엽 건조 중량의 10 %~20%의 유지(대두유)를 분사하여 고루 섞이도록 첨가하여 24시간 친유적 반응을 할 수 있도록 숙성한다.
7	초임계 추출공정	<input type="checkbox"/> 건조 녹차잎 20kg을 초임계 추출조에 충전한 후, 3시간 동안 추출하여 초임계 녹차 추출액을 얻는다.

라. 녹차 지용성 성분을 이용한 체지방 억제 활성 전임상 실험

(1). 콜레스테롤 개선 실험 in vitro 연구 결과

(가). 녹차 기름 추출물에 의한 간세포 활성화 및 세포 성장에 미치는 영향 분석

○ 녹차 기름 추출물을 사람 간세포 HepG2에 처리하여 세포생장을 분석하였다 (그림 1). 기녹차 기름 추출물을 10⁻⁵에서 10⁻⁹까지 희석하여 간세포에 처리하여 본 결과 10⁻⁵에서 세포 생존율을 감소시키는 것으로 나타났으나 10⁻⁶이하에서는 대조군과 별다른 차이는 인정되지 않았다. 따라서 본 시험에서는 자체가 간세포 손상에 영향을 미치지 않는 농도인 10⁻⁶이하가 적정 할 것으로 판단이 되었다.



(나). 포화지방산인 palmitic acid 처리 시 녹차 기름 추출물에 의한 간세포 보호효과 분석

○ 포화지방산인 palmitic acid 500uM을 HepG2에 처리하여 세포의 약 70%가 사멸하는 조건에서 녹차 기름 추출물을 처리한 간세포는 세포사멸 효과가 차단되었다 (그림 2).

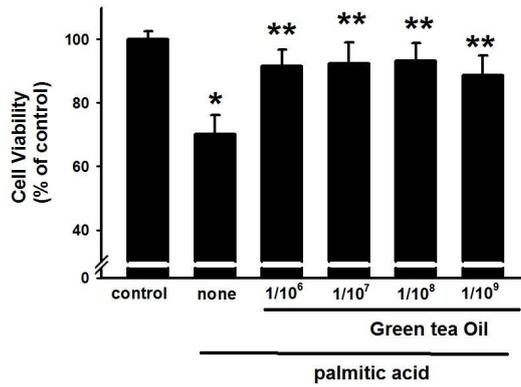


그림 2. 간세포에서 Green tea oil의 palmitic acid에 의한 세포 사멸 차단 효과

(다). 간세포에서 녹차 지용성 성분의 triglyceride 농도 및 지방 축적 억제 작용

○ 간세포에서 녹차 지용성 추출물에 의한 FFA에 의한 triglyceride 함량 저해 작용을 측정하였다. 실험 결과 간세포에 palmitic acid를 처리하였을 때 triglyceride 함량은 증가하는 것으로 관찰되었다. 이러한 palmitic acid에 의한 triglyceride 함량증가 작용은 녹차 지용성 추출물 1/10⁸ 이상에서 차단되는 것으로 관찰되었다 (그림 3).

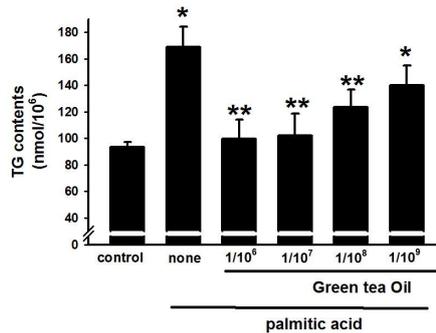


그림 2. 간세포에서 Green tea oil의 palmitic acid에 의한 세포 사멸 차단 효과

○ 녹차 지용성 추출물이 FFA에 의한 지방 축적을 차단하는지를 Oil Red Staining을 실시하였다. 실험 결과 간세포에 palmitic acid를 처리하였을 때 Oil Red staining시 지방의 함량이 현저하게 증가하는 것으로 관찰되었다. 이러한 palmitic acid에 의한 지방 축적의 증가 작용은 녹차 지용성 추출물 1/10⁸ 이상에서 차단되는 것으로 관찰되었다 (그림 4).

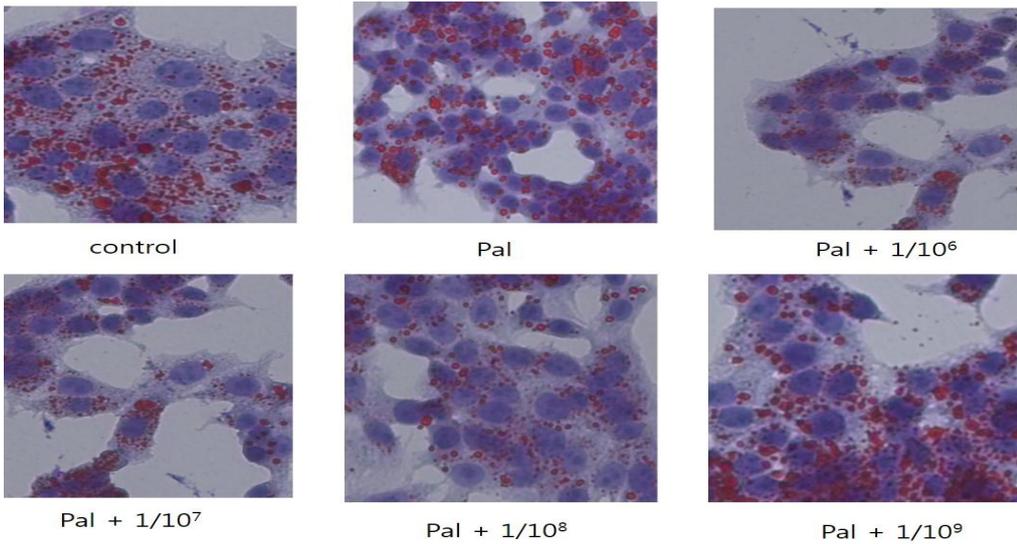


그림 4. 간세포에서 Green tea oil의 palmitic acid에 의한 지방 축적 차단 효과.

(라). Western immunoblotting을 이용하여 녹차 기름 추출물이 지방 합성 관련 효소의 발현에 미치는 효과 분석

○ Western blot을 이용하여 지방합성 관련 효소의 발현을 측정한 결과 녹차 기름 추출물에서 억제 시키는 것으로 나타났다 (그림 5). 실험 결과 간세포에 palmitic acid를 처리하였을 때 지방 합성에 관련되는 단백질인 SREBP-1 c의 발현이 증가하는 것으로 관찰되었다. 아울러 fatty acid synthase 발현 역시 증가하는 것으로 확인되었다. 아울러 지방합성에 관련되는 ACC의 발현 및 지방 합성 말기에 관련되는 SCD-1의 발현 역시 증가하는 것으로 관찰되었다. 이러한 palmitic acid에 의한 지방 축적의 증가 작용은 녹차 지용성 추출물 1/108 이상에서 차단되는 것으로 관찰되었다

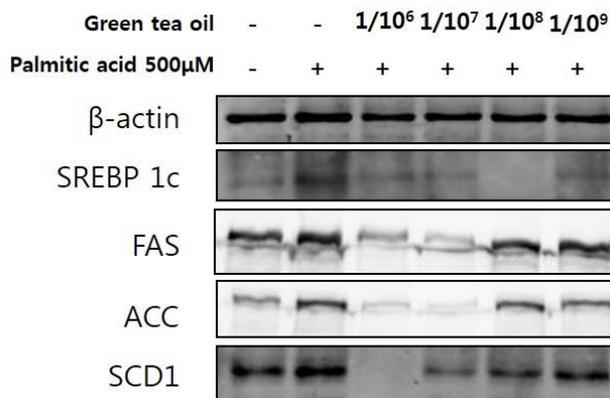


그림 5. 간세포에서 Green tea oil의 palmitic acid에 의한 지방 합성 관련 단백질 차단 효과.

○ 간세포에서 지방의 protection에 관련되는 단백질인 Sirt-1, GLP-1R 및 p-AMPK를 측정하였다. 실험 결과 간세포에 palmitic acid를 처리하였을 때 sirt-1의 발현은 변화가 인정이 되지 않았으나 GLP-1R 및 p-AmpK의 활성은 억제 되는 것으로 확인되었다. 이러한 palmitic acid에 의한 GLP-1R 및 AMPK의 활성 억제 작용은 녹차 지용성 추출물 1/10⁸ 이상에서 차단되는 것으로 관찰되었다 (그림 6).

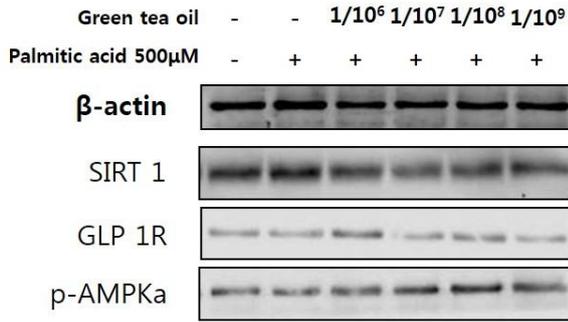


그림 6. 간세포에서 Green tea oil의 palmitic acid에 의한 sirt-1, GLP-1R 및 AMPK의 활성화에 대한 차단 효과.

○ 간세포에서 cholesterol 대사에 관련되는 단백질들의 발현을 살펴 보았다. 실험 결과 ABCA1은 palmitic acid에 의해 변하지 않았으나 ABCG1 및 ABCG8 발현은 증가하는 것으로 관찰되었다. 녹차 지용성 추출물에 의해서는 ABCG1만이 억제 되는 것으로 관찰되었다 (그림 7).

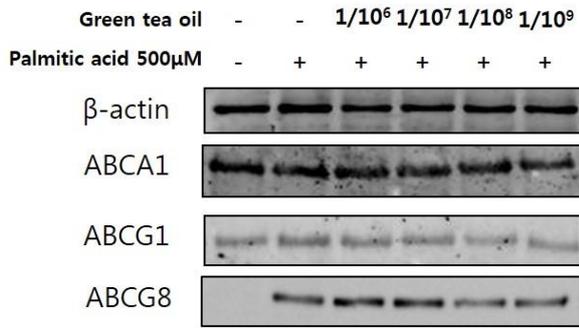


그림 7. 간세포에서 Green tea oil의 palmitic acid에 의한 cholesterol 대사 관련 단백질의 발현 변화

○ 간세포에서 지방산 beta 산화에 관련되는 단백질의 발현을 살펴 보았다. 실험 결과 지방산 산화에 관련되는 단백질인 ACOX-1 및 HADHA의 경우는 억제되는 것으로 관찰되었으며 녹차 지용성 추출물에 의해서 차단되는 것으로 확인되었다 (그림 8).

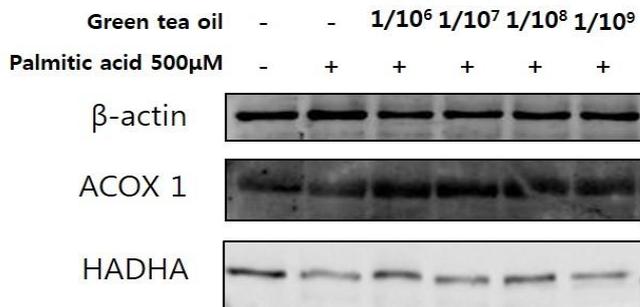


그림 8. 간세포에서 Green tea oil의 palmitic acid에 의한 지방산 베타 산화 관련 단백질의 발현 변화.

(2). 콜레스테롤 개선 시험 *in vivo* 연구 결과

(가). 고콜레스테롤 식이 모델 쥐를 통해 녹차 지방 추출물이 체지방 합성에 미치는 효과 분석

C57BL/6J 마우스에 고콜레스테롤 식이와 농도별로 녹차 기름 추출물을 투여 후 체중과 식이량을 분석하였다. 실험결과 고콜레스테롤 식이식에서 체중은 현저하게 증가하였으며 이는 녹차 기름 추출물에 의해서 차단이 되었다 (표1). 또한 하루 식이량도 모든 군에서 거의 일정하게 섭취한 것으로 보아 사료 섭취량에 따른 무게의 증가가 인정되지 않았다 (표 2).

Table 1. Effect of extracts of green tea oil on body weight in C57BL/6J mice fed HCD for 2 weeks

Group	Initial body weight (g)	Body weight after 2 weeks (g)
Control	22.92±0.44	26.76±0.72
HCD	22.66±0.22	31.07±0.54
Green tea oil low dose (0.2%)	22.50±0.26	29.79±0.84
Green tea oil middle dose (1%)	22.64±0.40	29.32±1.15
Green tea oil high dose (5%)	22.68±0.34	28.70±0.75

HCD: high cholesterol diet

2-3. 3차년도

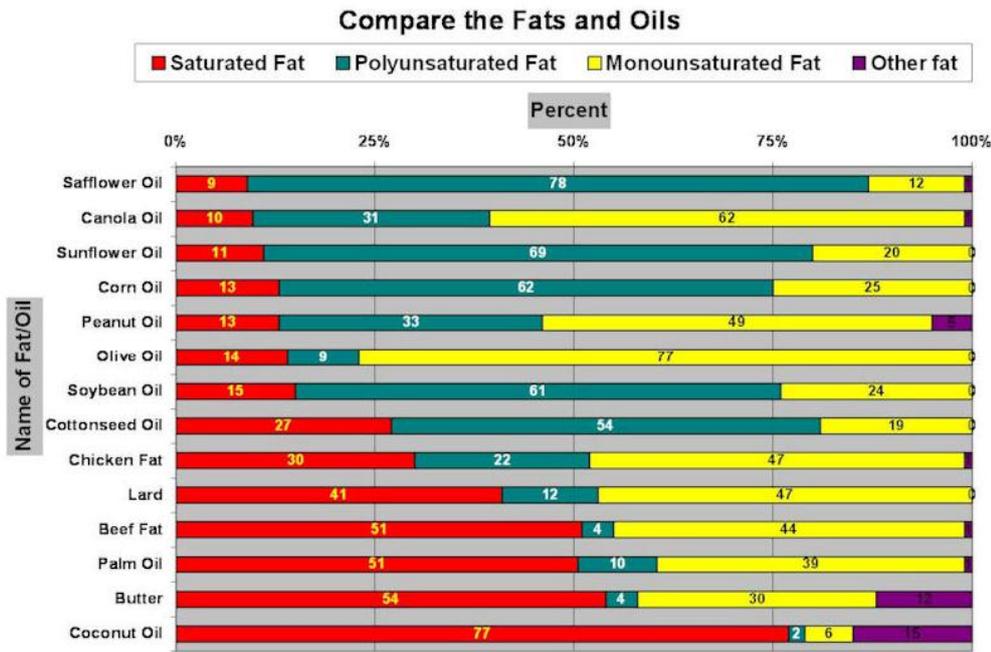
가. 지용성 녹차 추출물을 이용한 케토제닉 유지 (Lard 등) 대체 원료 개발

최근 탄수화물 대신 지방의 섭취를 늘려, 간에 저장된 지방을 몸의 주요 원료로 활용하는 방식의 케토제닉 식단의 인기로 식품업계도 변화를 맞으리라는 전망이었다. 케토제닉 다이어트는 지방의 섭취를 늘려 신체가 ‘케토시스’ (Ketosis) 상태에 머무르도록 하는 방식으로 식단을 짠다. 지방을 70~75%, 탄수화물을 5~10%, 단백질을 20~25%로 섭취한다. 간질, 치매, 당뇨병 예방 및 염증성 질환에 효능을 보인다. 케오제닉 식단이 주목받은 것은 특히 단기간 체중감량에도 효과가 크기 때문이다.

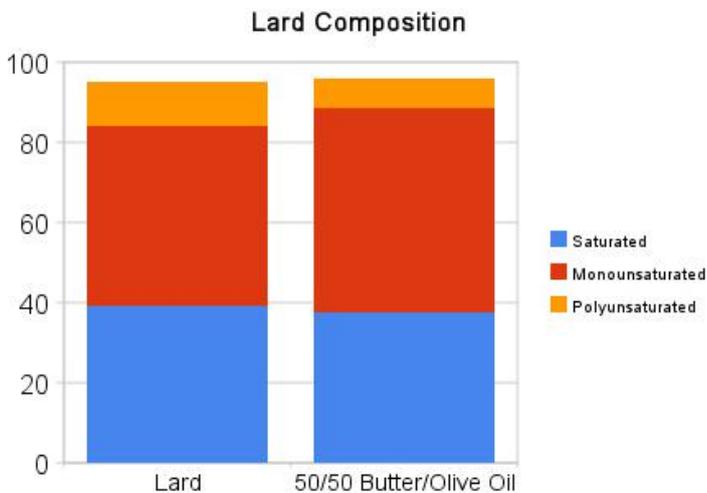
케토제닉 식단의 인기로 주목받는 지방 식품으로는 ‘기 버터’가 대표적이다. 기버터는 인도에서 유래한 지방으로, 이 지역에선 수천년 간 버터 대신 기버터를 사용했다. 목초를 먹인 소에서 얻는 기버터는 최근 몇 년 사이 기존의 버터를 대체하는 건강한 버터로 주목받고 있다. 이른바 ‘버터의 왕’으로 불리고 있다.

또다른 케토제닉 식단의 지방식품은 lard이다. Lard에는 포화지방은 물론 불포화지방과 리놀렌산이 들어 있다. 일부 연구에선 이 성분들을 통한 건강상 이점을 밝히기도 했다. MCT(Medium-chain Triglyceride) 오일은 중쇄지방산으로 알려진 포화지방산의 한 종류다. 코코넛오일의 지방에서 50% 이상 추출되는 식물성 오일로, 스무디나 방탄 커피, 샐러드 드레싱에 주로 사용한다. MCT 오일이 인기를 모은 것은 체중감량 효과가 뛰어나다는 점이 알려졌기 때문이다. MCT 오일은 우리 몸이 포만감을 느끼게 하는 펩티드 YY와 렙틴 호르몬 분비에 도움을 줘 식이 조절 효과가 있다. MCT 오일은 코코넛 오일에서 유래하지만 코코넛 오일보다 체중 감량 효과가 더 뛰어나다는 장점이 있다. 최근 전 세계 식품업계에선 MCT 오일로 만든 케토 영양바나 스낵들이 출시되고 있다. 국내에서도 그 흐름이 나타났다. 커피전문점 탐앤탐스는 무염 버터와 MCT 오일을 넣은 ‘빠다커피’를 MD상품으로 판매했으며, 편의점 GS25에서도 방탄커피를 만들 수 있는 ‘케토제닉 메이트팩’을 선보였다. 코코넛 버터도 몇 해 전부터 유행하기 시작한 동물성 버터 대체제다. 코코넛 버터는 열대 지방의 ‘땅콩버터’라고 불릴 만큼 흔한 식물성 지방이다. 상온에선 고체이지만, 가열하면 액체가 되고, 은은한 코코넛 풍미가 일품이다.

케토제닉을 위한 Lard 대체 물질 개발에 대한 연구를 진행하였다(그림1). Lard는 주로 포화지방산이 41% 정도이며 1가 불포화지방산이 약 47%이며, 다가 불포화지방산이 12%정도를 차지하고 있다. Lard 조성과 유사한 조성비를 위하여 다양한 식물성 유지를 블렌딩하여 실험한 결과(그림2), 올리브유 50% : 팜유 50%를 혼합하여 Lard와 비슷한 지방조성을 제조하였다.



<그림1. 다양한 지방 조성비 비교>



<그림2. Lard와 대체 혼합유지 조성비>

나. 총 페놀 화합물

폴리페놀 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 항산화 작용, 항혈전 작용, 고지혈증과 지방간 억제 작용 등의 활성을 갖는다고 알려져 있다¹⁵⁾. 녹차 초임계 추출물과 대조구인 대두유에 존재하는 총 페놀 화합물 함량을 분석한 결과, 녹차 초임계 추출물이 2.5 mg/g, 대두유 0.8 mg/g 으로 녹차 초임계 추출물이 대두유보다 약 3배 정도 많이 함유하고 있음이 확인되었다.

다. Gallic acid, catechins, theaflavins 분석

녹차의 주요 polyphenol 성분인 catechin은 생체내에서 암 발생율을 낮추어주고 과산화 지질의 생성을

억제하여 노화를 지연시키며, 혈청중의 지질농도를 저하시켜 중성지질의 생성을 억제함으로써 비만을 방지하고 모세혈관의 저항력을 증진시킨다고 알려져 있다^{16,17}.

녹차 초임계 추출물과 녹차의 catechin류 함량을 분석한 결과(표 1), 녹차에서는 항암·항염증 효과가 높다고 알려진 (-)-epigallocatechin 3-*O*-gallate (EGCG)와 (-)-epicatechin 3-*O*-gallate (EGC)가 다량 검출된 반면 녹차 초임계 추출물에서는 항산화 효과가 특히 뛰어나다고 알려진 ECG가 가장 많이 검출되었다. Theaflavin류는 녹차에서는 전혀 검출되지 않았지만 녹차 초임계 추출물에서는 theaflavin (TF)와 theaflavin-3-gallate (TF3G), theaflavin-3,3'-di-*O*-gallate (TF3,3'DG) 등이 검출되었다. Theaflavin류는 catechin류의 산화, 중합에 의해 생성된 물질로 항산화, 항종양, 항염증 작용이 있으며, 혈압강화와 항균 효과는 catechin류 보다 높다고 알려져 있다¹⁸. 한편, 높은 항산화 효과와 유지에 첨가하였을 때 지방의 자동산화를 억제한다고 알려진 gallic acid¹⁹는 녹차에서 극히 미량이 검출되었으나 녹차 초임계 추출물에서는 49.5 mg/g의 수준으로 검출되었다.

표 1. Contents of gallic acid, catechins and theaflavins in supercritical fluid extract of green tea(GT-SFE) and green tea

(unit : mg/g)

	Samples	
	GT-SFE	Green tea
Gallic acid	49.5	0.3
(-)-epigallocatechin	N.D.	47.3
Catechin	0.6	0.3
(-)-epicatechin	N.D.	9.4
(-)-epigallocatechin 3- <i>O</i> -gallate	2.7	32.8
(-)-epicatechin 3- <i>O</i> -gallate	7.8	4.9
Theaflavin	1.2	N.D.
Theaflavin-3- <i>O</i> -gallate	2.1	N.D.
Theaflavin-3'- <i>O</i> -gallate	N.D.	N.D.
Theaflavin-3,3'-di- <i>O</i> -gallate	0.7	N.D.

N.D. : not detected

라. 갈산 함량이 증대된 녹차 추출물의 제조방법

본 연구는 녹차의 갈산 함량이 증대된 녹차 농축액 추출물의 제조를 위한 실험으로, 녹차 농축액 제조 방법을 새롭게 개발하여 제조된 녹차 추출물은 항비만 및 미백 효과가 우수한 갈산(gallic acid)을 0.05 내지 0.5 mg/ml 함량으로 포함함으로써, 항비만용 식품 조성물 및 피부 미백용 화장품 조성물의 유효성 분으로 유용하게 사용될 수 있다.

녹차의 갈산의 효능은 다양하다. 항산화 작용, 항박테리아, 항바이러스, 항염, 항알레르기 및 암세포에 대한 항암 활성 등이 있는 것으로 알려져 있다. 특히 갈산은 체지방 감소, 혈중 콜레스테롤 개선 및 피부 미백 효과가 우수하다고 알려져 있다. 갈산은 지방이 소화되는 과정에서 적절히 작용한다. 음식으로 지방을 섭취하면 이자 지질분해효소가 분비되면서 지방이 지방산과 모노글리세리드(MG)로 분해된다. 그리고 소장내 세포 속으로 들어가 중성지방으로 합성된 뒤 혈관을 타고 이동한다. 혈관에서는 지단백질 지방분해효소(LPL)에 의해 다시 지방산으로 분해되고 지방세포에 흡수돼 다시 중성지방으로 바뀐다. 에너지로 사용되지 않은 중성지방은 지방 조직에 축적된다. 섭취한 지방이 체내에 쌓이는 과정이다. 갈산은 이자지질분해효소 활성을 억제한다. 지방이 몸에 흡수되기 좋은 상태로 분해되는 것을 줄이는 효과와 같다. 지방이 흡수되지 않고 배출되도록 돕는다. 갈산은 담즙산과도 결합해 담즙산이 지방의 소화작용을 돕고 난 뒤 간으로 재흡수 되는 것을 막는다. 재흡수가 억제되면 몸이 체내 콜레스테롤을 사용하면서 콜레스테롤 농도가 감소한다. 보이차가 혈중 콜레스테롤 개선에 도움이 된다고 하는 이유이다. 이러한 다양한 효능이 있는 갈산은 주로 차 종류에 함유되어 있으며, 특히 보이차에 많이 함유되어 있다고 알려져 있다. 그러나, 보이차는 가격이 비싸 소비자들이 쉽게 접하기 어려운 문제가 있다. 또한, 보이차의 효과를 제대로 보려면 일정량을 매일 마셔야 하며, 건강에 도움이 되려면 하루에 갈산 35mg을 섭취해야 한다. 이는 연구를 통해 도출된 유효 섭취량이다. 일반적으로 보이차 한 잔에 갈산이 약 1.06mg 들어 있다는 점을 고려하면 하루에 33잔을 마셔야 한다.

본 연구(Table 2)에서는 보이차에 비해 상대적으로 가격이 저렴한 녹차를 이용하여 갈산 함량이 증대된 추출물을 제조하기 위하여 연구하여 왔으며, 녹차를 저급알코올로 추출한 추출물을 산 처리하는 경우 녹차 추출물에 포함되어 있던 EGCG 및 ECG 등의 카테킨이 갈산으로 전환되어, 갈산 함량이 현저히 증대된 녹차 추출물을 제조할 수 있음을 확인하였다.

Column	CAPCELL PAK C18 UG120 (4.6 × 250 mm, Shiseido, Japan)		
Mobile phase	A: 1 mM NaH ₂ PO ₄ buffer (pH 2.5) containing 1 mM EDTA · 2Na B: 100% Acetonitrile		
Injection	20 mL		
Flow rate	1 mL/min		
Wavelength	275 nm		
Gradient	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	92	8
	5	92	8
	37.5	85	15
	70	83	17
	80	83	17
	81	92	8
	90	92	8

또한, 본 연구의 목적은 상기 갈산 함량이 증대된 녹차 추출물을 유효성분으로 포함하는 항비만용 식품 조성물 또는 피부미백용 화장품 조성물을 제공하는 데 있다. 상기한 목적을 달성하기 위하여 본 연구는 (1) 전처리 단계 : 찻잎을 물리적 방법을 통하여 감압 가열을 통하여 열처리 한 후, 냉각 단계; (2) 210℃에서 15~20 분간 로스팅 단계; 냉각 후 분쇄 과정을 통하여 수용액으로 추출하는 추출물 제조단계; 및 (2) 상기 추출물을 산처리하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 갈산 함량이 증대된 녹차 추출물의 제조방법을 제공한다.

본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 알코올 수용액의 농도는 50 내지 80 %(v/v)일 수 있다.

본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 (1) 단계의 추출물은 녹차 1 중량부에 대하여 상기 알코올 수용액을 30 내지 80 중량부로 혼합하고 30 내지 90 분 동안 정치시킨 후 여과하여 수득한 것일 수 있다.

본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 (2) 단계의 산처리 전에 초음파 또는 마이크로파, 또는 초음파와 마이크로파를 병용하여 조사하는 전처리 단계를 더 수행할 수 있다.

본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 초음파 조사는 15 내지 25 kHz 및 500 내지 800 watt로 2 내지 30 분간 조사되며, 상기 마이크로파 조사는 2000 내지 3000 MHz 및 50 내지 400 watt로 5 내지 60초간 조사하는 것일 수 있다.

본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 산처리는 (1) 단계에서 수득한 추출물 100 중량부와 산성 용액 50 내지 150 중량부를 혼합한 후, 80 내지 120 °C에서 5 내지 90 분간 수행될 수 있다.

본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 산성 용액은 묽은 염산, 묽은 황산, 묽은 질산, 포름산 및 아세트산으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

본 발명은 또한, 상기의 제조방법에 의해 제조되어, 갈산(gallic acid)을 0.05 내지 0.5 mg/ml 함량으로 포함하는 녹차 추출물을 제공한다.

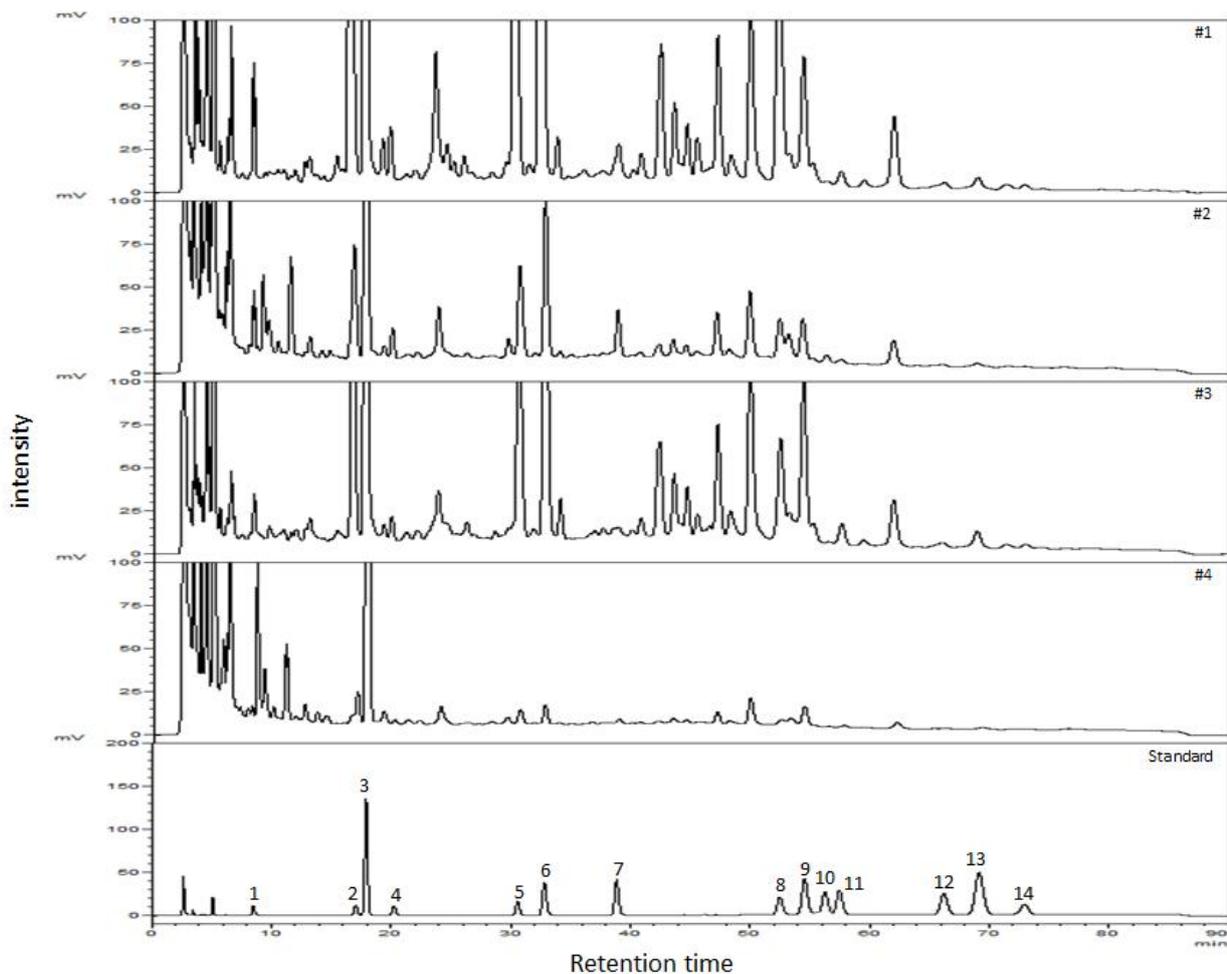
본 발명은 또한, 상기 녹차 추출물을 유효성분으로 포함하는 항비만용 식품 조성물을 제공한다.

본 발명은 또한, 상기 녹차 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물을 제공한다.

본 발명의 방법에 따라 제조된 녹차 추출물은 갈산(gallic acid)을 0.05 내지 0.5 mg/ml 함량으로 포함함으로써, 항비만용 식품 조성물 및 피부 미백용 화장품 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

표 2. 초임계 처리 시간에 따른 갈산 함량 비교

	Content (mg/100 ml)							
	초임계 처리 로스팅 3분		초임계 처리 로스팅 10분		초임계 미 처리 로스팅 3분		초임계 미 처리 로스팅 10분	
	평균	편차	평균	편차	평균	편차	평균	편차
Gallic acid	22.33629	0.22946379	367.39842	0.63552589	66.00449	1.12663524	186.76387	0.42548257
GC	32.6706561	0.85802969	22.6917637	2.14926559	18.486117	2.49162408	42.2373395	1.95448216
EGC	236.638856	3.83489494	55.8092221	0.58769643	123.751397	2.62400065	13.5484926	2.10279344
Caffeine	46.3760198	0.23651974	33.6545294	0.49101694	41.2232582	1.01867782	23.979427	0.90897272
C	14.2731903	1.10112268	10.1207565	0.03953085	9.49064838	0.92033858	7.16870135	0.21949192
EC	90.2416287	2.11200662	20.2741192	0.48695987	52.1051242	0.88116778	5.36738753	0.26020974
EGCG	60.6531857	0.93590078	8.71330186	0.13146817	29.2859427	0.70799221	1.98171409	0.10198985
GCG	3.39594173	0.75142483	3.4910852	0.02301018	1.3776462	0.01111726	1.23701942	0.02967008
ECG	18.7479687	13.8890788	5.37867055	0.5341451	11.779679	1.04970286	1.46879452	0.15678095
Q-gal	6.16880266	0.13276982	2.50710792	0.02655416	7.61998629	0.14730165	1.37502418	0.0863382
G-glc	2.06789634	0.16314357	0.97244718	0.06820838	1.93960885	0.04452181	0.57242131	0.02829094
CG	2.1106288	0.13305823	1.49857895	0.00549517	2.54371273	0.05598398	0.88905409	0.06634515
K-gal	0.68430769	0.11550157	0.40702931	0.09981999	0.54285432	0.13019517	0.28130994	0.05832997
K-glc	0.69801902	0.03402392	0.50220824	0.02882924	0.92695575	0.105211	0.28793493	0.0635701
DK	0.62907377	0.08424234	0.22256012	0.03018674	0.49623079	0.03610128	0.16369469	0.0476506



- 1**, gallic acid (GA); **2**, epigallocatechin (EGC); **3**, caffeine; **4**, catechin (C); **5**, epicatechin (EC); **6**, epigallocatechin gallate (EGCG); **7**, gallic acid (GA); **8**, epicatechin gallate (ECG); **9**, quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside (Q-gal); **10**, quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside (Q-glu); **11**, catechin gallate (CG); **12**, kaempferol-3-O-β-D-galactopyranoside (K-gal); **13**, kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside (K-glu); **14**, 2,3-trans-dihydroxykaempferol (DK).

Sample No.		gallic acid	GC	EGC	catechin	Caffein	EC	EGCG	GCG	EOG	CG	TF3D	TF	TFM	Total
원처리	로스 (분)														
초임계 처리	3	22.33629	99.62479	2531.57729	129.95976	429.77545	468.76363	519.40416	17.05244	106.44529	35.90980	6.56981	2.68801	2.06385	4372.17058
		22.45022	100.46627	2541.26335	131.06549	429.58236	469.80453	529.26740	16.95930	109.20224	34.48374	6.90020	2.81966	2.20782	4396.47260
		22.41697	98.99392	2551.78804	132.10749	430.23514	469.53255	527.95725	19.89945	109.77148	36.37978	6.84908	2.85529	2.30486	4411.09129
Ave.		22.40	99.69												
초임계 처리	5	45.54156	205.32914	1791.04884	161.94094	376.26201	362.33482	488.59453	35.28833	106.76426		5.91192	4.39482e-1	1.15239	3580.61821
		45.50567	207.57158	1792.78269	161.46164	376.47737	362.81134	483.42723	35.10370	103.78704		6.26100	5.93018e-1	1.16853	3576.95082
		45.25070	206.01389	1791.73225	161.95902	378.77250	361.79700	491.22095	35.55600	106.05350		6.31694	3.90853e-1	1.86681	3586.96040
Ae.		45.43													
초임계 처리	10	367.39842	132.29771	270.26379	70.33820	346.08311	61.64601	71.02649	21.60062	11.18177			2.59618	2.73038	1359.89651
		366.63363	105.73048	275.62751	69.87548	342.80366	61.02347	68.67056	22.02579				2.65252	1.95460	1316.99772
		366.54982	103.67842	265.45476	69.53645	342.50241	61.09782	68.32160	21.75336				2.71560	2.11854	1308.87019
Ave.		366.86													
초임계 미 처리	3	66.00449	51.12374	1066.05036	65.45414	278.82874	218.49978	234.08525	14.53481	32.72132	5.99010	6.08182	7.53661	1.54574	2048.45690
		66.20043	51.10486	1120.79856	65.77017	279.19684	219.06180	232.74002	14.49248	40.94286	5.96094	4.71613	6.73806	1.44629	2109.16943
		66.13037	49.87516	1059.59622	52.02832	278.91473	218.60860	235.03887	14.61893	41.71538	6.16303	6.11661	7.21032	1.47396	2037.49052
Ave.		66.11													
초임계 미 처리	5	62.58692	63.61714	1107.70267	62.91346	315.31372	217.02421	291.56131	16.55888	57.52186	7.74498	5.21408	11.97732	4.87718	2224.61373
		62.57574	64.61661	1111.03668	79.50322	315.41832	217.12674	284.69803	16.46991	55.23949	7.37642	5.28660	8.27295	1.78887	2229.40958
		62.09839	61.48808	1097.37417	79.75512	315.42099	217.21374	285.98899	16.70864	49.12430	2.93698	5.09234	2.81706	4.35796	2200.37675
Ave.		62.42													
초임계 처리	10	186.76387	47.67101	118.23879	32.17397	227.82600	32.28943	47.07950	9.77221	4.30248	2.92906	6.42934	8.71559	10.23321	734.42448
		187.87904	46.68911	119.08306	31.78802	228.86933	32.39147	48.25030	9.99846	5.55638		6.24996	11.12872	15.41903	743.30289
		187.13061	37.10704	138.31940	31.09416	228.30173	32.11217	49.03983	10.19104	5.62734			12.32150	15.93046	747.17527
Ave.		187.26													

마. 차엽으로부터 혼합 유지 (Palm oil 50%:Olive oil 50% : P50:O50)를 이용한 지용성 성분 추출

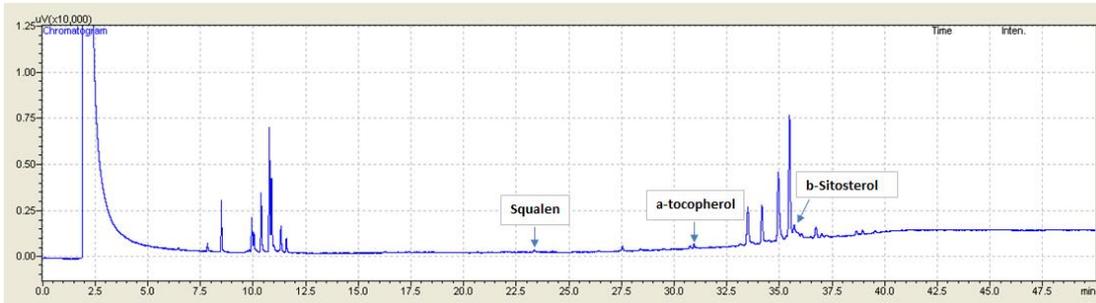


표 3은 분쇄 건조 차엽에 혼합 유지 (P50:O50)를 용매로 사용하여 1시간 30분 동안 지용성 성분을 추출하여 얻은 폴리코사놀 함량을 나타낸 것이다. 혼합유지 (P50:O50)를 용매로하여 얻은 추출물의 경우에는 폴리코사놀 함량이 매우 낮았다. 따라서 혼합유지 (P50:O50)를 추출용매로 사용 시 추출효율이 극히 낮은 편이라고 사료된다. 표 4 및 5은 각각 건조 차엽 식용유 추출물 중의 피토스테롤 및 토코페롤 함량을 나타낸 것이다. 보조용매를 사용하지 않고 얻은 건조차엽 초임계 추출물 중에 함유된 피토스테롤 및 토코페롤 함량은 각각 513 및 45 mg/kg 이었다. 이 결과에서도 식용유 추출시 초임계유체 추출, 핵산추출 등의 기타 방법에 비하여 피토스테롤 및 토코페롤 함량이 매우 낮은 것을 나타낸 것이다.

표 3. 건조차엽의 혼합유지 (P50:O50)를 이용한 추출물에 함유된 폴리코사놀 함량 및 조성

Policosanols	혼합유지 (P50:O50) 추출물 (mg/kg)
C20-OH	1.42
C21-OH	0.20
C22-OH	4.34
C23-OH	0.81
C24-OH	3.94
C25-OH	0.72
C26-OH	10.19
C27-OH	1.35
C28-OH	37.65
C29-OH	2.61
C30-OH	54.59
C31-OH	3.26
C32-OH	23.98
C33-OH	2.36
C34-OH	2.64
Total	150.07

표 4. 건조 차엽의 혼합유지 (P50:O50)를 이용한 추출물에 함유된 피토스테롤 함량

	beta-Sitosterol	Campesterol	Stigmasterol
혼합유지 (P50:O50) 추출물	514.33 ± 36.02	-	-

표 5. 건조차엽의 혼합유지 (P50:O50)를 이용한 추출물에 함유된 토크페롤 함량

	alpha-Tocopherol	beta-Tocopherol	gamma-Tocopherol	delta-Tocopherol
혼합유지 (P50:O50) 추출물	45.68 ± 23.61	-	-	-

바. 찻잎으로부터 추출한 지용성 물질을 첨가한 녹차유의 산화 안정성 측정

(1). 다양한 식용유에 녹차유를 농도별로 용해하여 제조한 녹차-식용유의 자동산화 안정성

대두유, 현미유, 카놀라유 및 옥수수유 등 4종의 식용유에 5% 및 10%의 농도로 녹차유를 첨가한 녹차유-혼합식용유를 제조한 후 삼각플라스크에 시료를 30g씩 정확히 칭량하여 dry oven에 넣고 60±1℃의 가온 조건 하에 보관하였다. 이때 대조구로는 녹차유를 첨가하지 않은 각각의 식용유를 이용하였으며, 이들 식용유들을 일정시간이 경과할 때 마다 2.5g씩 채취하여 식용유의 과산화물가 및 공액지중결합지방산 (CDA) 함량을 측정하여 산화지표를 측정하였다. 공액지중결합지방산 함량은 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 233 nm에서 흡광도를 측정하여 표시하였다. 그림 3은 각각 콩기름, 현미유, 채종유 및 옥수수유에 녹차유를 5% 및 10% 함유된 녹차-식용유 및 그 대조구를 60℃의 가열조건에서 6일 동안 저장한 후 과산화물가를 측정하여 그 과산화물가의 증가치를 비교한 것이다. 콩기름을 이용하여 제조한 녹차-식용유의 결과에서 보면 대조구(콩기름), 5%녹차-식용유, 및 10% 녹차-식용유의 과산화물가가 증가값은 각각 75.0 69.5, 및 65.7 meq/kg oil 이었다. 이 결과는 콩기름에 녹차유의 첨가량이 증가할수록 과산화물의 생성을 억제하는 효과가 있음을 확인 한 것이다.

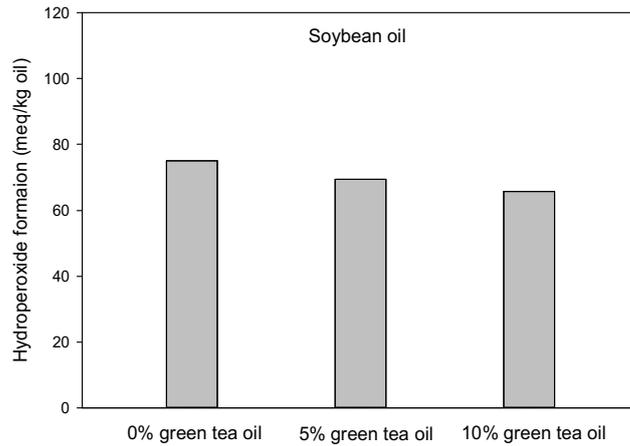


그림 3. Change of the peroxide value in soybean oil containing different concentration green tea oil stored for 6 days at 60°C

그림 4-6에서 보는 바와 같이, 대두유의 경우와는 달리 현미유, 채종유, 및 옥수수유에서는 일반적으로 녹차유를 첨가하게 되면 과산화물가 생성이 증가되는 현상을 보였다. 현미유를 이용하여 제조한 녹차-식용유의 결과에서 보면 대조구(현미유), 5%녹차-식용유, 및 10% 녹차-식용유의 과산화물가 증가값은 각각 33.4 46.3, 및 48.8 meq/kg oil 이었다. 채종유를 이용하여 제조한 녹차-식용유의 결과에서 보면 대조구(채종유), 5%녹차-식용유, 및 10% 녹차-식용유의 과산화물가 증가값은 각각 43.2 40.6, 및 51.1 meq/kg oil 이었다. 채종유를 이용하여 제조한 녹차-식용유의 결과에서 보면 대조구(채종유), 5%녹차-식용유, 및 10% 녹차-식용유의 과산화물가 증가값은 각각 37.9, 46.8, 및 49.7 meq/kg oil 이었다. 이러한 식용유의 차이에 따라 녹차유의 첨가가 산화안정성을 증가시키는 경우와 산화를 촉진시키는 두 가지 다른 경우를 나타내는 이유는 아마 녹차유를 추출할 때 사용된 식용유로 산화안정성이 비교적 낮은 대두유를 사용했기 때문일 것으로 추정된다. 즉 이결과는 녹차잎에서 추출된 성분들 자체에서는 약한 항산화활성을 가지고 있는데, 이 성분들을 추출하는 추출용매로 사용된 대두유의 낮은 산화안정성으로 인하여 대두유에서는 항산화활성을 나타내지만, 대두유보다 산화안정성이 높은 식용유들에서는 대두유자체의 낮은 산화안정성으로 인하여 녹차유첨가 식용유에서 산화안정성이 떨어지는 것으로 추정된다.

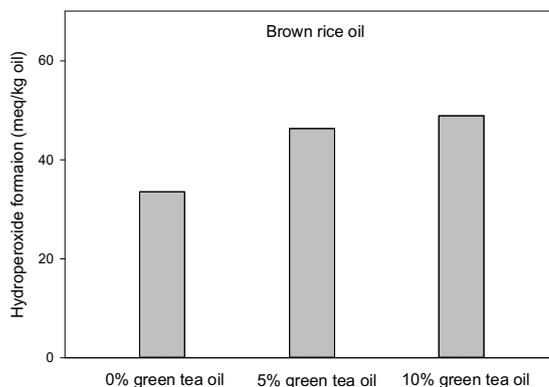


그림 4. Change of the peroxide value in brown rice oil containing different concentration green tea oil stored for 6 days at 60°C

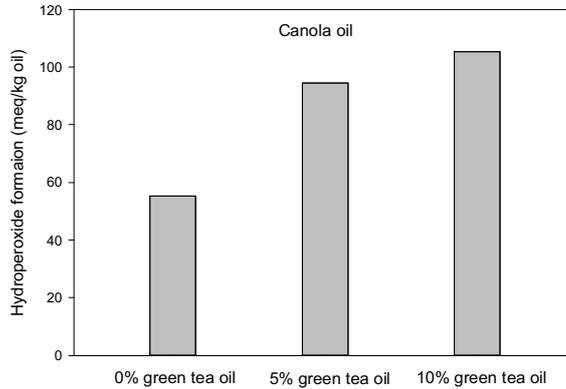


그림 5. Change of the peroxide value in canola oil containing different concentration green tea oil stored for 6 days at 60°C

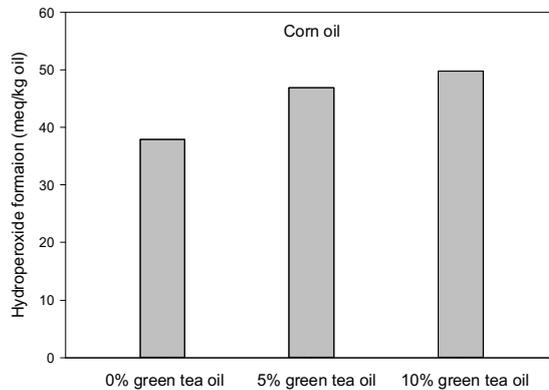


그림 6. Change of the peroxide value in corn oil containing different concentration green tea oil stored for 6 days at 60°C

(2). 다양한 식용유에 녹차유를 농도별로 용해하여 제조한 녹차-식용유의 광산화 안정성

대두유, 현미유, 채종유 및 옥수수유 등 다양한 식용유에 5%, 10%의 농도 별로 녹차유를 첨가하여 녹차유-혼합식용유 제조한 후 각 이들 녹차유-혼합식용유들 및 각각의 식용유들을 대조구로 하여 삼각플라스틱에 시료를 30g 씩 정확히 칭량하여 5000LUX의 형광등이 설치된 light box에 넣고 광선조사 조건하에 보관하였다. 일정시간이 경과할 때 마다 2.5g씩 채취하여 식용유의 산화지표인 과산화물가 및 공액이 중결합지방산 함량을 측정하였다. 그림 7~10에서 보는 바와 같이, 대두유, 현미유, 채종유, 및 옥수수유에서는 일반적으로 녹차유를 첨가하게 되면 광선이 조사되는 광산화 조건하에서는 이들 녹차첨가 혼합유에서 과산화물가 생성이 현격히 증가되는 현상을 보였다. 대두유를 이용하여 제조한 녹차-식용유의 결과에서 보면 대조구(대두유), 5%녹차-식용유, 및 10% 녹차-식용유의 과산화물가 증가값은 각각 48.3, 96.3, 및 106.6 meq/kg oil 이었다. 현미유를 이용하여 제조한 녹차-식용유의 결과에서 보면 대조구(현미유), 5%녹차-식용유, 및 10% 녹차-식용유의 과산화물가 증가 값은 각각 34.4 97.0, 및 92.1 meq/kg oil 이었다. 채종유를 이용하여 제조한 녹차-식용유의 결과에서 보면 대조구(채종유), 5%녹차-식용유, 및 10% 녹차-식용유의 과산화물가 증가 값은 각각 55.3, 94.5, 및 105.3 meq/kg oil 이었다. 옥수수유를 이용하여 제조한 녹차-식용유의 결과에서 보면 대조구(옥수수유), 5%녹차-식용유, 및 10% 녹차-식용유의 과산화물가 증가 값은 각각 37.4, 101.5, 및 106.8 meq/kg oil 이었다.

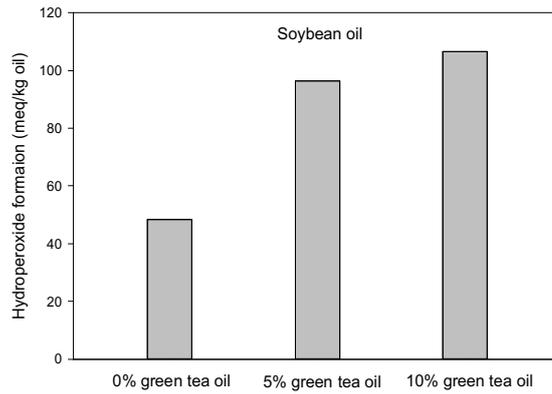


그림 7. Change of the peroxide value in soybean oil containing different concentration green tea oil stored for 4 days under light at 5000 lux

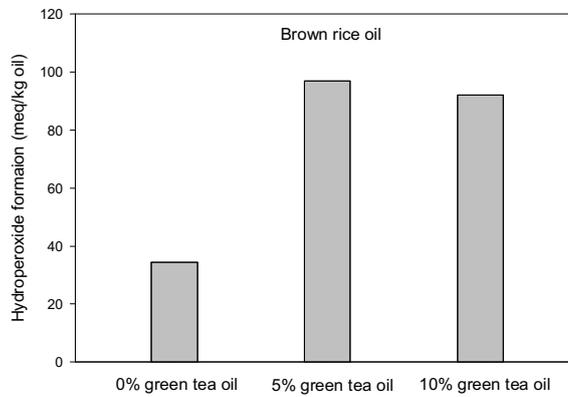


그림 8. Change of the peroxide value in brown oil containing different concentration green tea oil stored for 4 days under light at 5000 lux

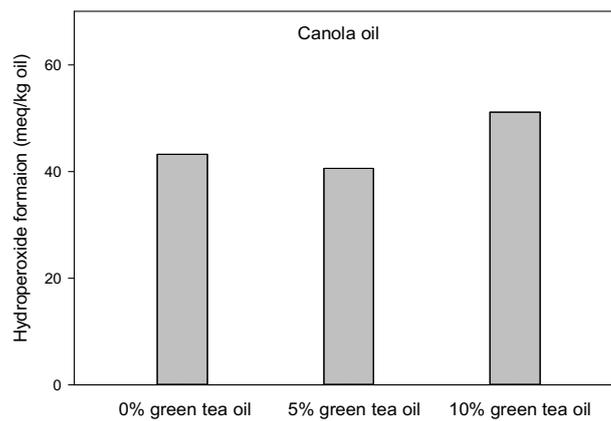


그림 9. Change of the peroxide value in canola oil containing different concentration green tea oil stored for 4 days under light at 5000 lux

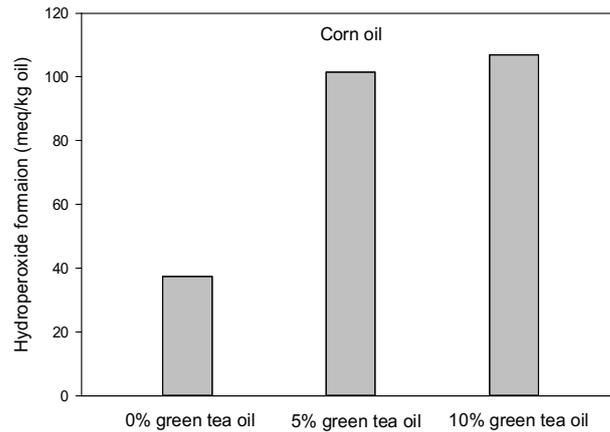


그림 10. Change of the peroxide value in corn oil containing different concentration green tea oil stored for 4 days under light at 5000 lux

사. 항산화 활성이 강한 천연항산화제 선택 연구

(1). 천연항산화제 종류에 따른 자동산화 억제 활성

녹차유 (10%)–혼합 대두유에 녹차풍미유, 폴리페놀스, 로즈마리 추출물, 토코페롤혼합물 등의 다양한 상업적으로 이용이 가능한 천연항산화제를 0.3%의 동일한 농도로 첨가한 후, 첨가하지 않은 대조구와 함께 각각 삼각플라스크에 30g씩 정확하게 칭량하여 dry oven에 넣고 $60 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 가온 조건 하에 보관하였다. 일정시간이 경과할 때 마다 2g씩 채취하여 식용유의 산화지표를 측정하였다. 그림 11에서 보는 바와 같이 녹차풍미유 및 폴리페놀스를 0.3% 첨가한 대조구에서는 과산화물의 생성을 거의 완벽하게 억제하는 효과를 확인하였다. 그러나 토코페롤혼합물의 경우에는 3일 저장 후 부터는 오히려 과산화물의 생성을 촉진하는 결과를 보였다. 그리고 로즈마리 추출물 (0.3%) 처리구에서도 과산화물의 생성을 강하게 억제하는 활성을 보였으나 그 활성이 녹차풍미유나 폴리페놀스에 비하면 적은 편이었다. 그림 12는 이들 천연항산화제를 첨가한 녹차유–혼합대두유의 가온 저장 조건에서 공액이중결합지방산 (Conjugated double bond fatty acid, CDA) 생성에 미치는 영향을 분석한 결과이다. 이 결과에 의하면, 과산화물의 생성과 거의 동일하게 저장기간이 증가할수록 CDA생성량이 증가하였다. 일부 천연항산화제들은 이들 CDA의 생성을 매우 효과적으로 억제하였다. 그러나 토코페롤혼합물의 경우에는 저장 2일째부터 강력하게 이들 CDA의 생성을 증가시키는 것으로 확인하였다. 그러나 로즈마리 추출물의 경우는 과산화물 측정결과와는 달리 폴리페놀스 및 녹차풍미유와 더불어 강력한 CDA생성억제 활성을 보였다. 그리고 이들 천연항산화제들 사이에는 큰 차이들 보이지 않았다.

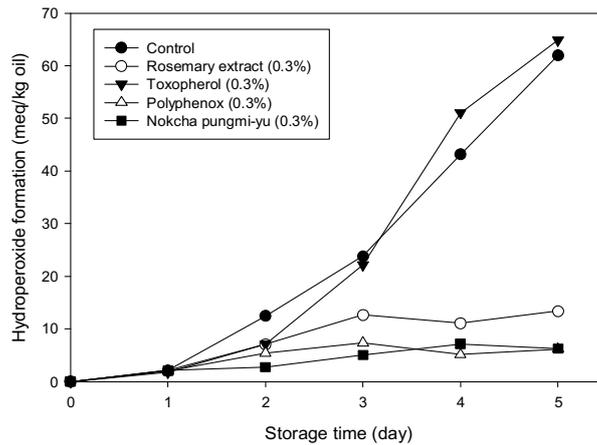


그림 11. Effects of natural antioxidants (0.3%) on the change of the peroxide value in soybean oil containing 10% green tea oil stored for 6 days at 60°C.

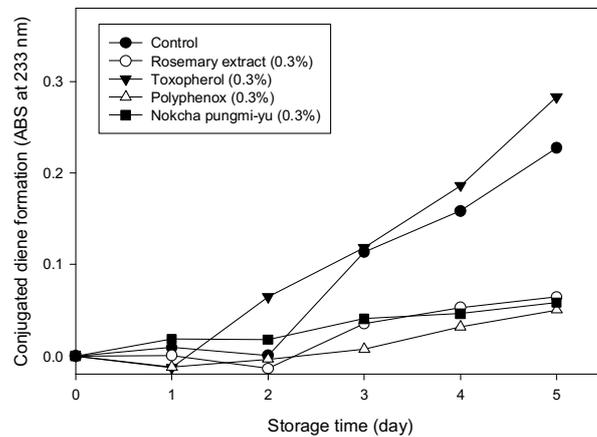


그림 12. Effects of natural antioxidants (0.3%) on the change of the conjugated dienoic acid (CDA) formation in soybean oil containing 10% green tea oil stored for 6 days at 60°C.

(2). 천연항산화제 종류에 따른 광산화 억제 활성

녹차유 (10%)-혼합 대두유에 녹차 풍미유, 폴리페녹스, 로즈마리 추출물, 토코페롤혼합물 등의 다양한 상업적으로 이용이 가능한 천연항산화제를 0.3%의 동일한 농도로 첨가한 후, 첨가하지 않은 대조구와 함께 각각 삼각플라스틱에 30g씩 정확하게 칭량하여 형광등이 설치된 light box에 넣고 5000LUX의 광도로 광선조사 조건하에 보관하였다. 일정시간이 경과할 때 마다 2g씩 채취하여 식용유의 산화지표(과산화물가 및 CDA함량)를 측정하였다. 그림 13과 14는 각각 이들 천연항산화제를 첨가한 녹차유-혼합대두유의 광저장 조건하에서의 과산화물가 및 CDA함량변화를 측정된 값을 나타낸 것이다. 광산화실험에서는 자동산화실험 결과와는 아주 상반된 결과를 나타내었다. 그림 13에서 보는 바와 같이, 자동산화실험에서 강력한 과산화물가 억제효과를 보였던 로즈마리 추출물, 폴리페녹스 및 녹차풍미유 등의 천연항산화제들은 광산화에서는 거의 과산화물생성을 억제하는 효과를 나타내지 않았다. 그러나 자동산화에서는 산화를 촉진하던 토코페롤 혼합물 (0.3%) 처리구에서 광산화조건하에서는 과산화물 생성을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다. 그리고 그림 14에서 보는 바와 같이 이러한 이들 항산화제들 중에 역시 토코페롤혼합물이 가장 강력한 CDA생성을 억제하는 것으로 나타나서, 과산화물생성억제효과와 더불어 토코페롤은 광산화를 효과적으로 억제하는 것으로 확인된 것이다. 그리고 녹차 풍미유는 광산화조건하에서 녹

차유-혼합식용유의 CDA생성을 억제하는 효과가 없었으나, 로즈마리 추출물과 폴리페놀스의 경우에는 0.3% 처리 시에 유의성 있는 CDA생성억제 효과를 나타내었다. 이러한 자동산화 및 광산화조건하에서 과산화물 및 CDA생성을 억제연구를 통하여 이들 천연항산화제들 중에 폴리페놀스가 강력한 자동산화억제 및 어느 정도의 광산화 억제효과를 가지고 있어서 녹차유의 저장 중에 저장안정성을 증진시키기 위한 산화 억제용 항산화제로 적합한 것으로 판단되어 농도의 최적화를 위한 농도별 실험을 행하였다.

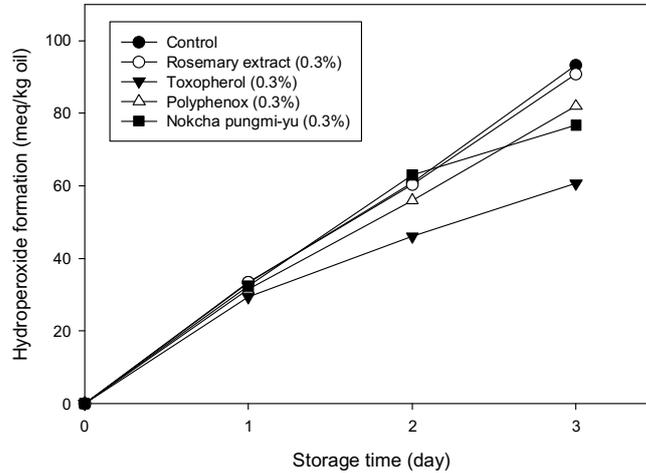


그림 13. Effects of natural antioxidants (0.3%) on the change of the peroxide value in soybean oil containing 10% green tea oil stored for 3 days under light at 5000 lux

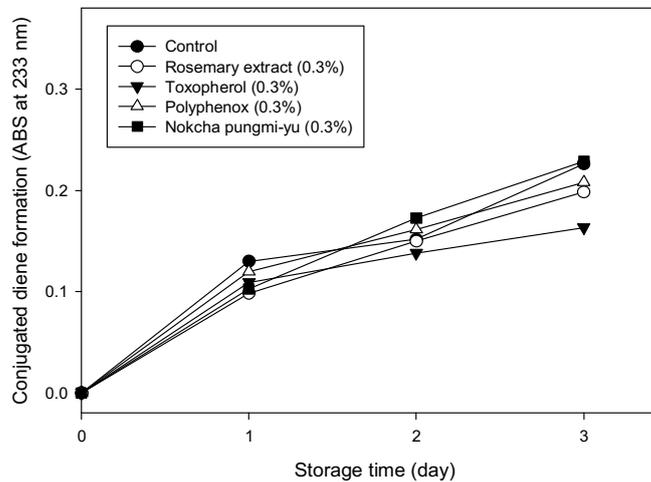


그림 14. Effects of natural antioxidants (0.3%) on the change of the conjugated diene formation in soybean oil containing 10% green tea oil stored for 3 days under light at 5000 lux

(3). 폴리페놀스 농도별 녹차유-혼합식용유의 자동산화 안정성 연구

녹차유(10%)-혼합 대두유에 천연항산화제인 폴리페놀스를 0.1%, 0.2%, 0.3%의 다양한 농도로 제조한 후 폴리페놀스를 첨가하지 않은 대조구와 함께 각각 삼각플라스크에 30g씩 정확하게 칭량하여 dry oven에

넣고 $60\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 가온 조건 하에 보관하면서, 일정시간이 경과할 때 마다 2g씩 채취하여 식용유의 산화 지표인 과산화물 및 CDA의 생성량을 측정하였다 (그림 15 및 16). 그림 28 및 29에서 보는 바와 같이, 폴리페놀스를 첨가한 모든 군에서는 강력한 과산화물 생성 및 CDA생성억제 효과를 나타내었다. 뿐만 아니라, 함량이 0.1% - 0.3%의 농도범위에서는 모두 그 효과가 매우 뛰어나서 0.1% 농도에서 거의 완벽하게 과산화물 및 CDA의 생성을 억제하였으며, 그 농도를 0.3% 까지 증가하여도 그 억제 활성이 증가하지도 않고 산화를 촉진하는 경향도 나타내지 않았다. 이는 일반적으로 알려진 토코페롤 혹은 아스코르빈산 등의 최적농도이상에서의 고농도에서는 산화촉진을 유도하는 경우와는 다른 양상을 보이는 것으로서 항산화제로서는 매우 적합한 특성을 가지고 있는 것으로 확인되었다.

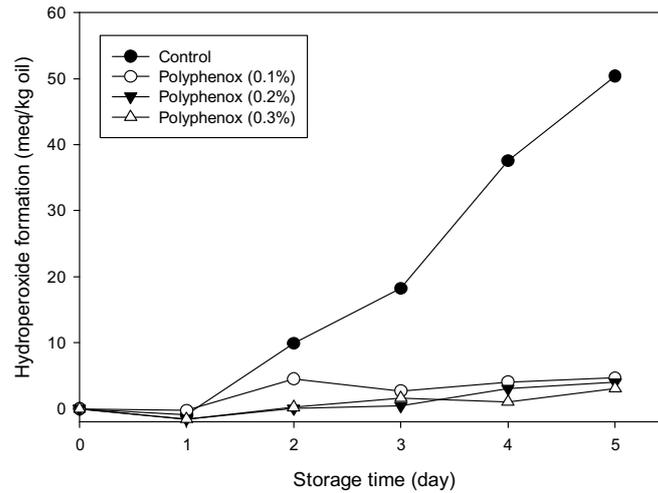


그림 15. Effects of different concentrations (0.1, 0.2, and 0.3%) of natural antioxidant (polyphenox) on the change of the peroxide value in soybean oil containing 10% green tea oil stored for 6 days at 60°C .

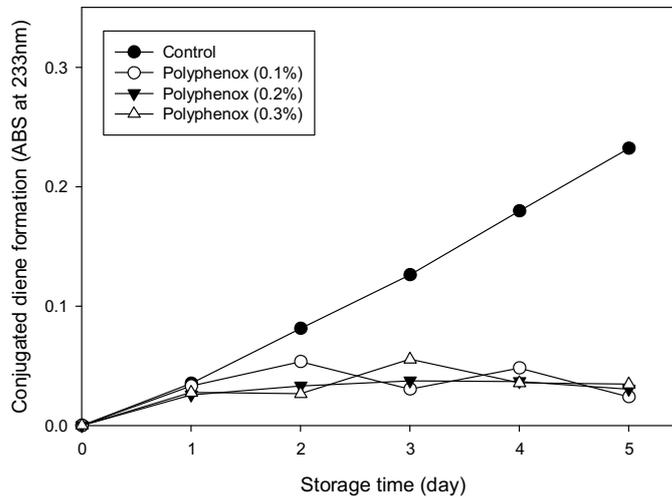


그림 16. Effects of different concentrations (0.1, 0.2, and 0.3%) of natural antioxidant (polyphenox) on the conjugated dieneic acid (CDA) formation in soybean oil containing 10% green tea oil stored for 6 days at 60°C .

(4). 광산화억제를 위한 beta-carotene 활성 연구

녹차유(10%)-혼합 대두유에 천연항산화제인 베타-카로틴을 5, 10, 50, 및 100ppm의 다양한 농도로 첨가한 후 베타-카로틴을 첨가하지 않은 대조구와 함께 각각 삼각플라스크에 30g씩 정확하게 칭량하여 5000LUX 및 3000 LUX의 두가지 다른 광도로 광선조사 조건하에 광산화 안정성 실험을 행하였다. 일정

시간이 경과할 때 마다 2g씩 채취하여 식용유의 산화지표 (과산화물 및 CDA생성)을 측정하였다. 광도가 높은 상태에서는 동일한 광조사 시간에 광도가 낮은 광조사에 비하여 과산화물 및 CDA생성이 높았다. 이는 광선의 광도가 산화속도에 영향을 미친다는 기존의 이론과 일치하는 사실이다. 그림 17 및 18에서 보는 바와 같이 베타-카로틴의 농도를 5 ppm에서 100 ppm으로 증가함에 따라서 과산화물의 생성은 현격히 억제하는 것을 확인하였다. 그러나 그림 19에서 보는 바와 같이, 베타-카로틴의 첨가가 CDA의 생성을 억제하는데는 비교적 매우 미약했다. 그 이유는 광산화의 산화메카니즘중 일중항 산소가 관여하는 Type II경로에서는 자동산화와는 달리 공액이중결합의 생성을 유도하는 반응과 공액이중결합의 생성없이 산소와 반응하는 두가지 산화반응이 거의 50%씩 동시에 일어나기 때문에 그 효과가 적게 보이는 것으로 판단된다.

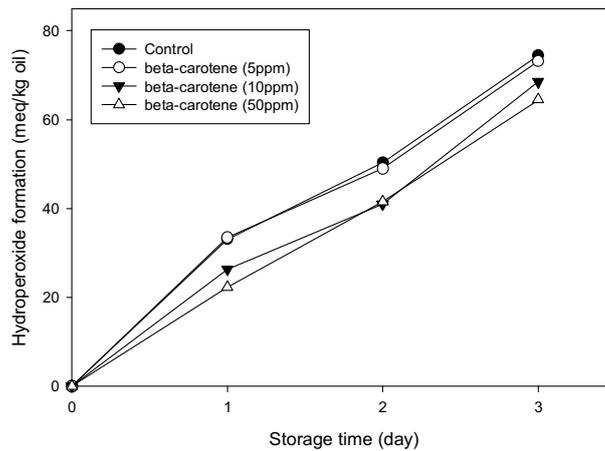


그림 17. Effects of different concentrations (5, 10, 50 ppb) of natural antioxidant (beta-carotene) on the change of the peroxide value in soybean oil containing 10% green tea oil stored for 3 days under light at 5000 lux

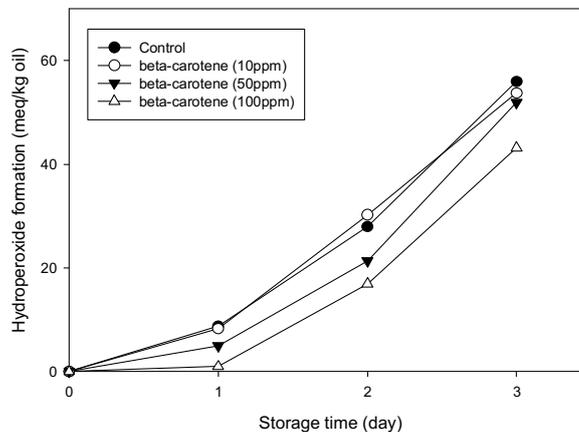


그림 18. Effects of different concentrations (5, 10, 50 ppb) of natural antioxidant (beta-carotene) on the change of the peroxide value in soybean oil containing 10% green tea oil stored for 3 days under light at 3000 lux.

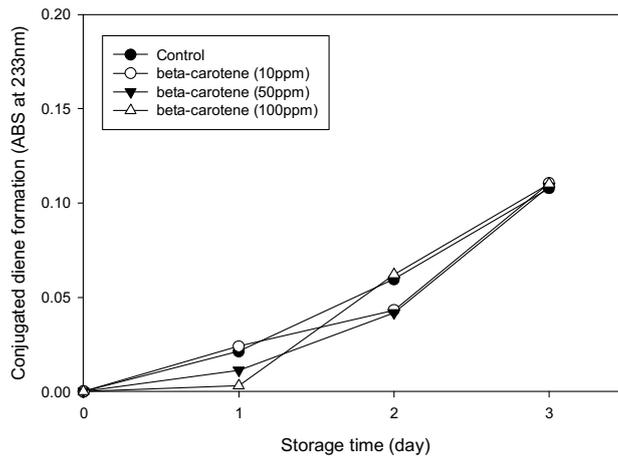


그림 19. Effects of different concentrations (5, 10, 50 ppb) of natural antioxidant (beta-carotene) on the conjugated dienoic acid (CDA) formation in soybean oil containing 10% green tea oil stored for 3 days under light at 3000 lux.

(5). 혼합 천연항산화제를 이용한 녹차유-혼합식용유의 자동산화 안정성 확보 연구

그 동안 연구결과에서 폴리페놀스는 자동산화를 억제 활성이 탁월하였고, 토코페롤 혼합물 및 베타-카로틴은 광산화 억제활성을 나타내었으므로, 이들 천연항산화제를 혼합하여 두 종류의 항산화제 혼합제를 개발하였다. 이들의 조성은 혼합항산화제 I (폴리페놀스 0.1% + 토코페롤 0.1%) 와 혼합항산화제 II (폴리페놀스 0.1% + 토코페롤 0.1% + 베타카로텐 50 ppm)이다. 이들 혼합항산화제를 녹차유(10%)-혼합 대두유에 첨가한 후 대조구(무처리구)와 함께 각각 삼각플라스크에 30g씩 정확하게 칭량하여 $60 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 가속실험을 행한 결과는 그림 20 및 21에 나타내었다. 이번 연구에서 이들 혼합항산화제 I 및 II는 자동산화를 억제하는 효과가 매우 탁월하였다. 6일 동안의 가속실험에서 과산화물 및 CDA의 생성을 약 90%가량 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

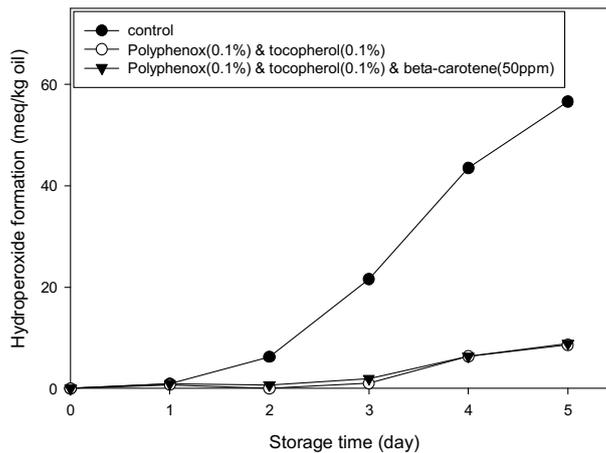


그림 20. Effects of natural antioxidant mixtures I (polyphenox 0.1% + tocopherol mixture 0.1%) and II (polyphenox 0.1% + tocopherol mixture 0.1% + beta-carotene 50 ppm) on the change of the peroxide value in soybean oil containing 10% green tea oil stored for 5 days at 60°C

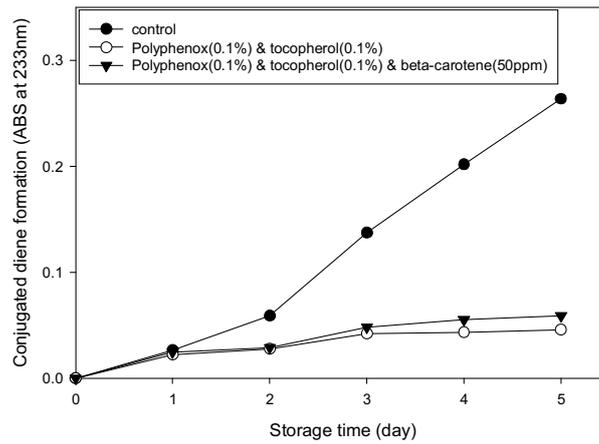


그림 21. Effects of natural antioxidant mixtures I (polyphenox 0.1% + tocopherol mixture 0.1%) and II (polyphenox 0.1% + tocopherol mixture 0.1% + beta-carotene 50 ppm) on the conjugated dienoic acid formation in soybean oil containing 10% green tea oil stored for 5 days at 60°C

(6). 혼합 천연항산화제를 이용한 녹차유-혼합식용유의 광산화 안정성 확보 연구

혼합항산화제 I (폴리페놀스 0.1% + 토코페롤 0.1%) 와 혼합항산화제 II (폴리페놀스 0.1% + 토코페롤 0.1% + 베타카로텐 50 ppm)를 녹차유(10%)-혼합 대두유에 첨가한 후 대조구(무처리구)와 함께 각각 삼각플라스크에 30g씩 정확하게 칭량하여 light box내에서 광도 3000 lux의 광선을 조사하면서 이들 혼합항산화제의 산화억제활성을 측정하였다. 그림 22 및 23은 각각 이들 항산화제들의 광산화에 의하여 생성되는 과산화물 및 CDA의 생성을 억제하는 활성을 나타낸 것이다. 이들 혼합항산화제들은 광산화 초기에는 매우 높은 과산화물 생성을 억제하는 것으로 확인되었으나, 나중에는 그 활성이 매우 약하게 나타났다. 따라서 이들 항산화제의 첨가는 녹차유의 초기 광산화 억제에 유효할 것으로 판단된다.

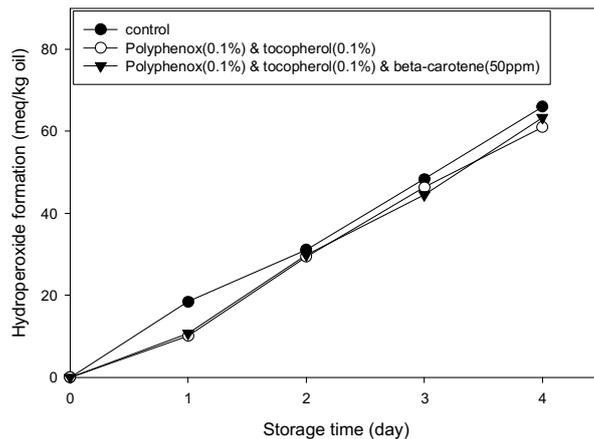


그림 22. Effects of natural antioxidant mixtures I (polyphenox 0.1% + tocopherol mixture 0.1%) and II (polyphenox 0.1% + tocopherol mixture 0.1% + beta-carotene 50 ppm) on the change of the peroxide value in soybean oil containing 10% green tea oil stored for 4 days under light at 3000 lux

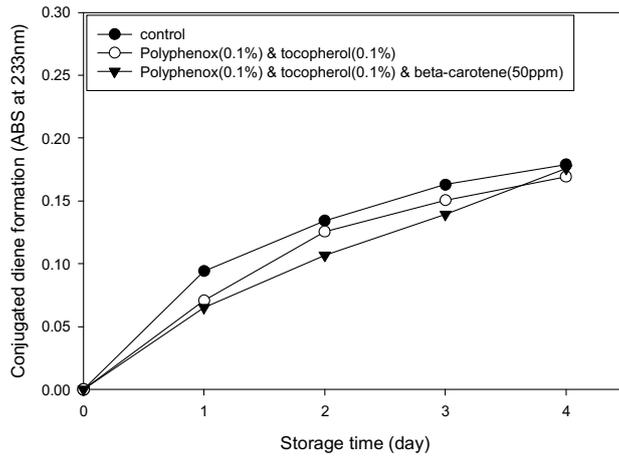


그림 23. Effects of natural antioxidant mixtures I (polyphenox 0.1% + tocopherol mixture 0.1%) and II (polyphenox 0.1% + tocopherol mixture 0.1% + beta-carotene 50 ppm) on the change of the peroxide value in soybean oil containing 10% green tea oil stored for 4 days under light at 3000 lux

아. 녹차잎 및 녹차제품으로부터 얻은 hexan 추출물 중의 스쿠알렌 함량

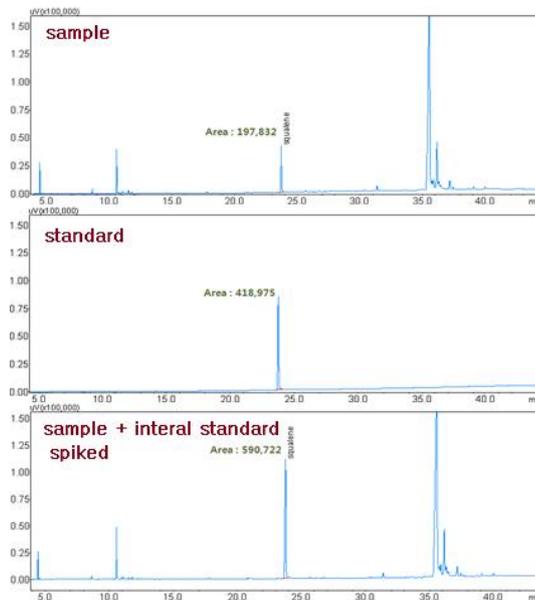


그림 24. GC chromatograms for the (A) green tea leave extract, (B) authentic squalene, and (C) green tea leave extract spiked with authentic squalene.

녹차 잡잎 및 녹차 어린잎, 시중에서 얻은 녹차제품 으로부터 hexan으로 추출하여 얻은 추출물 중에 함유된 스쿠알렌 함량을 분석하였다. 녹차어린잎 보다는 녹차 잡잎에서 얻은 hexan 추출물의 경우 얻을 수 있는 추출물의 양도 훨씬 많았고, 스쿠알렌 함량도 높게 나타났다 (표 6, 7). 녹차 잡잎 중에서도 8월에 얻은 추출물에서 27.17g/kg로 매우 높게 나왔다. 녹차 잡잎은 녹차로서 사용이 불가능한 버리는 잎으로서 이들 중에 스쿠알렌 함량이 매우 높게 나온 것은 녹차잎이 추후에 스쿠알렌의 원료로 사용이 가능하다는 것을 처음으로 확인한 것이어서 녹차의 고부가가치사업에 유용한 자원으로 활용될 가능성을 제시한 것이다. 시중에서 판매되는 녹차제품에서도 분석한 결과 그 함량이 녹차 잡잎에 비하여 월등히 적은

것으로 나타났다 (표 8). 이는 녹차제품이 어린잎을 사용한다는 사실로 보면 금번 연구결과가 녹차 잡잎에서 보다 어린잎에서 스푸알렌 함량이 적게 나온 이번 결과와 일치하는 것이었다.

표 6. 녹차 잡잎 으로부터 얻은 핵산 추출물 중의 스푸알렌 함량 분석

Old and turf leaves	Squalene in extract (g/kg)	Yield (%)
April	15.48 ± 1.43	5.17 ± 0.00
July	22.84 ± 0.04	5.07 ± 0.04
August	27.17 ± 1.36	5.59 ± 0.01
September	17.71 ± 1.08	7.23 ± 0.29

표 7. 어린 녹차잎 으로부터 얻은 핵산 추출물중의 스푸알렌 함량 분석

Young and tender leaves	Squalene in extract (g/kg)	Yield (%)
April	1.63 ± 0.39	1.79 ± 0.08
July	13.55 ± 0.08	1.60 ± 0.06
August	13.99 ± 0.10	1.53 ± 0.09
September	11.53 ± 0.09	1.63 ± 0.14

표 8. 녹차제품으로부터 얻은 핵산 추출물 중의 스푸알렌 함량 분석

Products	Squalene in extract (g/kg)	Yield (%)
Dongwon-Bosung	8.17 ± 0.02	3.02 ± 0.18
Soulrock Jacksul	1.25 ± 0.03	1.45 ± 0.02
Nochawon-Yukinong	5.18 ± 0.24	2.04 ± 0.02
Nockawon-Yukinong Infused	5.94 ± 0.38	2.27 ± 0.11

본 연구를 통하여 녹차잎에는 기능성 성분인 폴리코사놀이 다량 함유되어 있음을 처음으로 확인하였다. 그 함량이 약 1300 mg/kg 정도이었으며, 녹차용으로 사용이 불가능한 잡잎에서도 그 함량이 매우 높았다. 이는 폴리코사놀 함량이 높다고 알려진 whole sugar cane, sugar cane peel, sugar cane leave에 함유되어있는 폴리코사놀의 함량이 각각 17.4, 270, 및 181 mg/kg임을 감안하면 매우 높은 수치이다. 그리고 녹차잎의 폴리코사놀은 C28-OH 및 C30-OH이 주성분이었다. 뿐만 아니라, 차를 우려내고 남은 찌꺼기에서도 오히려 우려내기 전의 차잎 제품 보다 폴리코사놀 함량이 더 유의성있게 높았다. 이는 녹차 음료제조 후 잔여 찌꺼기 및 녹차로 사용이 불가능한 오래된 두꺼운 잡잎도 기능성 성분인 폴리코사놀의 원료로 사용이 가능하다는 사실을 처음 밝혀낸 것이다. 그리고 녹차잎에서 항암성을 갖는 스푸알렌이 함유되어 있다는 사실은 최초로 밝혀내었다. 이들 녹차잎에서 스푸알렌 함량은 8월에 채취한 잡잎에서 매우 높았으며 최고 약 1500 mg/kg이었다. 이는 녹차 제품으로 사용이 불가능한 잡잎이 스푸알렌의 원료로 사용이 가능하다는 사실을 처음 확인한 결과이다. 대두유를 보조용매로 사용하여 녹차잎에서 초임계 이산화탄소 추출법을 이용하여 얻은 녹차유의 산화안정성을 확보하기 위하여 다양한 천연항산화제의 활성을 비교 연구한 결과, 0.1% 폴리코사놀이 매우 좋은 자동산화억제 활성을 보였다. 그러나 이들 항산화제들은 녹차유의 광산화를 억제하는 효과는 비교적 약한 편이었다. 이는 녹차유의 특성중에 하나인 클로로필함량이 높아서 발생하는 자연적인 현상으로 판단된다. 따라서 이들 녹차유의 보관은 천연항산화제를 첨가한 후 광선이 차단되는 조건하에서 보관할 수 있는 포장 재질 혹은 캡슐 등을 이용하는 것이 바람직하다.

3절. 제2 협동기관 : 차산업연구소

1. 연구개발 추진전략 및 방법

가. 연구개발 추진전략

나. 연구개발 방법

(1). 블렌딩 베이스녹차 기준설정을 위한 보성산 녹차 품질평가

(가). 시험재료 : 봄녹차(5월 초순), 여름녹차(7월 초순), 가을녹차(9월 초순)

(나). 조사항목 : 차 품질평가를 위한 성분분석 및 관능평가

보성산 베이스녹차 평가항목	봄녹차(5월 초순)	여름녹차(7월 초순)	가을녹차(9월 초순)
성분분석	총아미노산, 탄닌 등		
관능평가	맛(30%)+향기(25)+차물색(15)+외형(20)+우린잎(10) = 100, ()가중치 ※ 한국차품질기준설정위원회 품질평가 항목 및 배점 준수		

(2) 국내외 시중 블렌딩녹차 제품 스크린 및 품질평가

(가). 시험재료 : 보성군내제품 1종, 타지역 국내제품 3종, 수입제품 1종

(나). 조사항목 : 시중 블렌딩녹차 제품군별 성분분석 및 관능평가

시중 제품군	보성군내 제품 1종	국내 제품(타지역) 2종	수입 제품 2종
평가항목			
상품특성	제품명, 기능성, 기호성 등의 상품적 제품 특성		
성분분석	총아미노산, 탄닌 등		
관능평가	맛(30%)+향기(25)+차물색(15)+외형(20)+우린잎(10) = 100, ()가중치 ※ 한국차품질기준설정위원회 품질평가 항목 및 배점 준수		

(다). 성분 분석방법

① 총질소 함량은 Gerhart_Kjelfiex 분석장비를 이용하여 킬달 자동분석법에 의해 결정하였다.

② 탄닌은 차잎 시료 분말 0.2g을 100mL 삼각플라스크에 넣고 80°C 증류수 80mL을 넣고 80°C 수욕조에서 30분간 항온시켜 꺼낸 후 찬물로 시킨 후 여기에 20mL 증류수를 첨가시키며, 이 시료를 No 2. Watman filter paper에 여과시킨 후 처음 20mL는 버리고 나머지를 시료로 사용하였다. Micro plate reader기에 사용하는 12well plate에 시료 0.5 mL을 넣고, 주석산 시약 0.5mL, KH₂PO₄ 완충액 1.5mL을 넣고 잘 흔들어준 다음 540nm 흡광도 측정하였으며, 표준물질은 ethylgallate로 분석하였다.

③ 총아미노산은 닌히드린법에 의해 정량분석하였으며, 표준물질은 glutamic acid를 사용하였다.

④ 색도는: 색차계(chroma meter, CR-300 Minolta Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 L값 명도, -a값 녹색도, b값 황색도를 3회 측정하였다.

- 최종적으로 총질소, 탄닌, 총아미노산, 색도 분석방법에 의한 데이터와 NIR(WINISI II analysis) 분석기를 이용한 결과의 상관관계를 도출하였으며, 신속 간편한 분석법으로 최적 결과값은 NIR 분석기에 의한 값으로 나타났다.

(라). 녹차 품질평가 항목 (한국차품질평가위원회의 기준 및 배점)

녹차 관능평가 항목	외형	차물색	향기	맛	우려낸 잎	총점수
	형태, 색택	색도, 명도, 탁도	향의 질량, 순수성, 고저, 종류, 지속성	진한 정도, 맛의 깊이, 감칠맛 정도	여린 정도, 균일한 정도, 색택	
가 중 치	20	15	25	30	10	100

(마). 국내외 시중 블렌딩 녹차 제품 시료 이력

제품 ID	K제품	R제품	W제품	G제품	S제품
생산지역	보성녹차	하동녹차	제주녹차	일본녹차	중국녹차
제조 및 판매원	영농조합 보성제다	마더팜	오설록	타바론코리아	타바론코리아
제품명	상쾌한 미풍	시크릿 루비	웨딩그린티	Genmaicha	Summer greentea
주원료	녹차, 서양박하, 라벤더	녹차, 히비스커스+ 산사열매	스위트부케향+ 마리골드+장미 꽃잎+콘플라워	현미55+녹차45	녹차96+ 천연살구향3%+ 해바라기꽃잎 1%
제품특성	상쾌한 느낌 진정작용 남성층 선호	히비스커스붉은빛 신맛, 아이스티에 어울림	달콤한 꽃향기 20~30대 여성층 선호	구수하고 깔끔한 현미녹차 전연령층 선호	살구향녹차 여성층 선호

(2)-1 시기별 베이스차 원료표준화를 위한 대량생산(10kg) 제조공정 구명

(가). 시험 재료는 시기별로 봄녹차(5월 초순), 여름녹차(7월 초순), 가을녹차(9월 초순), 보성지역에 소재하면서, 증제차와 덩음차를 제다할 수 있는 시설을 갖춘 B업체, N업체 및 D업체를 선정하였으며, 각 시기별로 차잎을 수확하여 증제차는 10kg 단위로 제조하였다.

(나). 차 품질평가를 위한 성분분석

총질소는 Gerhardt total nitroge analyzer를 이용한 분석방법을 적용하여 분석하였다. 0.2g을 취해서 황산분해 후 $N\% = (T-B) \times f \times N(\text{황산용액농도}) \times 14 \times 100/w$ T=시료 적정에 소비된 황산 표준용액의 mL수, B=공시료의 적정에 소비된 황산 표준용액의 mL수, f=황산표준용액의 보정치(factor), 0.01N 농도를 나타내며 위의 식에 적용하여 함량을 구하였다.

총아미노산 함량은 시료 0.3g을 정확히 취해서 80℃ 증류수 30mL을 가하고 80℃ 항온수조에서 30분간 shaking하면서 추출한다. whatman filter paper No2. 로 신속하게 여과한다.(마지막 20mL 증류수로 씻는다. 여과한 액에 PVPP 약 300mg 가하여 잘 흔들어 혼합한 다음 다시 whatman No 2 filter paper로 여과하여 그것을 시료용액으로 한다. 마지막 20mL 증류수로 씻어 최종 100mL로 정용한다. 정용한 용액을 총 유리아미노산 분석에 사용한다 냉장보관하며, 닌히드린 용액 제조는 닌히드린(ninhydrin, 특급) 1g을 Methyl cellosolve 50mL 중에 용해하고 구연산완충용액(0.4M 구연산을 2N NaOH로 pH 5.2로 조정) 250mL과 1:1로

혼합해 갈색병에 넣고 냉장소에 저장한다(제조 후 1주 이내 사용), 구연산 완충용액 제조 : citric acid monohydrate 210. 14g/1L=1M이므로→0.4M = 84.056g/1L (2N NaOH로 pH 5.2조정) 염화제이석(SnCl₂·2H₂O) 50mg을 구연산완충액에 용해해서 100mL로 정용하여 제조하며, 사용할 때마다 새로 만들며, 희석액:iso-propylalcohol과 증류수를 1:1로 혼합 제조하며, 아미노산 표준용액 glutamic acid를 1mg/mL로 제조하고, 단계별로 희석하여 표준용액을 만들었으며, 베이스녹차의 총 유리아미노산 정량분석은 20mL 시험관에 시료 0.5mL 취해 넣고 (Blank는 증류수 1mL 취함), 다투린 용액 0.25mL 넣고, 염화제이석 용액 0.25mL 넣고, 80°C 항온수조에서 30분 반응시킨 후 실온으로 신속하게 냉각, iso-propyl alcohol 2.5mL을 가하고, voltexing하며, 마이크로플레이트 리더기로 570nm에서 흡광도를 측정 후 표준곡선에 대비하여 정량하였다.

탄닌 함량은 베이스차 분말 시료 0.3g를 30mL 삼각플라스크에 넣고 80°C에서 30분 추출하여, 이 시료를 No2. 필터로 여과하여 시료로 사용한다. 분석 반응은 30mL 시험관을 준비한다. 시험관에 0.5mL의 시료 추출액을 넣고 여기에 주석산 시약 0.5mL을 첨가하고 그 후 완충액 1.5mL을 넣은 후 잘 흔들어주며, 반응시킨 시료용액을 microplate reader기에서 흡광도 파장 540nm에서 흡광도를 측정한다. 계산은 탄닌함량(%) = $G \times 1.5 \times 100 / W$ 에 적용하며 (G : 몰식자산 상당량 = 흡광도에서 환산된 농도, W : 100mL 중 시료 건물 중 (mg))

(다). 베이스녹차 관능평가

베이스녹차의 품질평가를 위해 한국차품질기준평가위원회가 제시하는 항목으로 외형(20%), 찻물색(15%), 향 (25%), 맛 (30%), 우려낸 잎(10%)으로 나누워서 평가하였다.

(2)-2 기능성 및 기호성 블렌딩녹차 부재료 소재 스크린 및 선발

(가). 블렌딩 소재는 전남 보성군 소재 강산농원에서 제조한 것으로 기억력개선 소재로 은행잎, 비파잎, 구기자, 목련꽃을 선발하였으며, 면역력 증진 소재로 민들레, 표고버섯, 우엉, 생강, 유자를 선발하였으며, 항산화성 소재로 대나무잎, 레몬그라스, 페퍼민트, 감국을 선발하였다.

(나). 기능성 평가방법 및 관능평가

항산화성은 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능 방법을 이용하였으며, 24 well에 차 추출물 0.5mL을 취하고, 0.5mM DPPH 시약을 1.5mL 취하고 마이크로플레이트 리더기에서 517nm 흡광도를 측정하였으며, 표준물질로는 ascorbic acid를 사용하였다.

AChE(acetylcholinesterase) 활성 저해능 분석은 기억력개선 효능을 평가하기 위해 실시하였으며, 2mL e-tube에서 0.1M phosphate buffer(pH 7.5)를 700uL에 차 추출물 시료 100uL를 취하고 효소(Sigma C0663) 100uL를 취하여 voltexing 후 37°C에서 incubation 20분 반응시킨 후 10mM DTNB(5,5' -Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) 50uL를 넣고 10mM acetylthiocholine iodide 50uL를 첨가하여 voltexing 후 37°C에서 incubation 20분 반응시킨 후 24well 플레이트로 옮긴 후 0.1N Tris-HCl(stop solution)를 200uL 첨가한 후 405nm에서 흡광도를 측정하였다. AChE inhibition activity(%)=(1-(A-B)/C)*100 식에 적용하여 계산하였다. (A: 차추출물의 흡광도, B:차 추출물의 대조구 흡광도, C:대조구 흡광도)

(다). 관능평가는 【시험 1】 과 동일하게 수행하였다.

(2)-3 블렌딩 베이스녹차 관능적 묘사분석 및 소비자 기호도 조사(부산대학교 위탁연구)

(가). 연구 목적은 블렌딩 베이스녹차 관능적 향미 특성 및 강도 평가로 차 성분과 상관관계 도출과 훈련된 패널(IRB 승인)에 의한 정성적·정량적 평가로 신뢰성 있는 관능평가와 강도를 측정하며, 블렌딩 녹차의 주 타겟 소비층을 상대로 소비자 기호도 조사를 위해 부산대학교 식품영양학과 감각과학 연구실에 위탁 수행하였다.

(나). 시기별(봄차, 여름차, 가을차) 및 제다방법별 블렌딩 베이스녹차 20종

	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩
	봄차	여름차	가을차	봄차+ 여름차	봄차+ 가을차	여름차 + 가을차	여름차 + 가을차	여름차 + 가을차	봄차+ 여름차+ 가을차	봄차+ 여름차+ 가을차
	100	100	100	50:50	50:50	50:50	25:75	75:25	10:20:70	10:40:50
증제차	①-1	②-1	③-1	④-1	⑤-1	⑥-1	⑦-1	⑧-1	⑨-1	⑩-1
뒤음차	①-2	②-2	③-2	④-2	⑤-2	⑥-2	⑦-2	⑧-2	⑨-2	⑩-2

(다). 소비자 기호도 조사 시료 6종

블렌딩차 제품	증제차	①-1 블렌딩차 기능성 A 향산화능 (노화방지)	②-1 블렌딩차 기능성 B (기억력 개선)	③-1 블렌딩차 기능성 C (면역력 증진)
	뒤음차	①-2 블렌딩차 기능성 A 향산화능 (노화방지)	②-2 블렌딩차 기능성 B (기억력 개선)	③-2 블렌딩차 기능성 C (면역력 증진)

(라). 시험재료 준비 및 방법

시료는 만들어서(끓인 물 80℃ 150mL에 티백 1개의 비율로 계산하여 2분 분간 우려내어 향미 특성을 개발하고 특성강도를 평가하였다. 평가에는 150mL 용량의 손잡이가 있는 유리잔 (Bistro Double-wall Insulated Glass Espresso Mug, Bodum)을 사용하였다. 소비자 기호도 조사에 사용된 차도 같은 조건으로 우려서 준비하였다.

(마). 베이스녹차 향미 묘사분석(향미 프로파일, 향미 강도), 소비자기호도 조사

베이스녹차 향미 묘사분석(descriptive analysis)는 특성강도를 나타내는 방법 중 하나로, 제품의 관능적 특성을 객관적으로 표현하는 방법이다. 고도로 훈련된 패널에 의해 제품에서 느껴지는 특성을 양적으로 나타내는 것으로, 관능 특성의 기초를 마련해준다. 묘사분석 방법 중 특히 Flavor Profile Method의 척도를 0-15점으로 수정하여 사용하였다.

묘사분석 패널 및 훈련 : 묘사분석에 참여하는 패널은 100시간 이상 고도로 훈련된 패널로서, 6명이 실험에 참여하였다. 전원이 참석하여 베이스녹차 향미 특성 분석에 들어가기 전 훈련과정을 거쳤다. 훈련과정에서는 시판 차 제품 3종(오설록 세작, 세작 티백, 및 뒤음차)과 베이스 녹차를 이용하여 훈련하였고, 시료의 향미 특성 용어 개발 및 표준물질 선정, 표준물질의 강도 설정의 과정을 거쳤다. 향미특성 용어(Lexicon) 개발하면서 토론을 통해, 모든 패널이 동의하는 용어를 선택하였다. Lexicon의 개발에 약 1달 정도의 기간이 소요되었고 이후, 베이스녹차 묘사분석을 실시하였다.

베이스녹차 향미프로필 묘사분석 : 베이스녹차 시료에 대한 묘사분석은 훈련과정에서 개발된

관능특성용어와 표준물질등을 이용해서 평가하며, 시료 평가는 0-15점 강도 척도법을 이용하였다. Flavor Profile 평가법을 사용하여 개별적으로 시료를 평가한 후에 패널 간 토론을 통하여 특성의 강도를 결정하는 Consensus방법으로 시료를 먼저 평가하였다. 이후 의견 교환이 이루어지지 않도록 칸막이가 있는 개별 부스에서 평가를 진행하였다. 각 시료의 특성과 강도 등에 대해 3번 반복하여 평가하였다. 시료 정보로 인한 편견을 방지하기 위하여 모든 시료는 3자리 난수로 표기하여 제공하였다.

소비자 기호도 조사(Consumer acceptability). ASTM 기준 : 소비자 기호도 조사는 제품, 제품의 개별, 제품의 특성에 관한 소비자의 반응을 조사하여 제품의 품질 유지, 품질향상, 최적화 및 신제품을 개발하는데 사용된다. 본 실험에서는 베이스 녹차를 이용하여 개발한 블렌딩 차의 특성에 대한 소비자의 기호도 검사(Consumer acceptability)를 9점 척도법으로 측정하였다. 소비자 패널 : 평소 차 및 음료류를 즐겨 소비하는 소비자를 대상으로 소비자 평가를 실시하였다. 소비자는 차류에 대한 알러지가 없고, 자발적인 참여 의사를 가진 소비자를 대상으로 모집하였다.

시료 평가 : 소비자 검사는 다른 소비자들과의 의견 교환이 일어나지 않도록 칸막이가 있는 개인 부스에서 진행하였다. 각 시료는 시료 정보에 대한 편견을 방지하기 위하여 3자리 난수로 표기하여 제공하였다. 시료에 대한 전반적인 기호도 및 향미 특성에 관한 기호도는 9점 척도법을 이용하여 측정하였다. 시료에 대한 평가 이외에도 나이, 성별 등에 관한 인적정보를 기입하도록 하였다.

(3)-1 기능성별 선호 블렌딩차 레시피 원료배합비 구명

(가). 시험재료

기능성별	베이스 녹차	부재료 소재
항산화성차(노화방지)	봄차:가을차 (50:50)	대나무잎, 레몬그라스, 페퍼민트, 감국
기억력개선차	봄차(100)	은행잎, 비파잎, 페퍼민트, 구기자, 목련꽃잎
면역력증진차	봄차:가을차 (50:50)	표고버섯, 생강, 유자

(나). 기능성별 블렌딩차 소재 처리방법

① 항산화성 블렌딩차 소재 전처리 방법

재료	베이스녹차와 부재료 전처리 방법
베이스녹차	증제차 제조공정에 따라 제조 (봄차:가을차 50:50)
대나무잎	원료채취 → 세척, 탈수 → 스팀 5분 → 60℃, 6시간 건조 → 분쇄 → 체 내리기 → 입자별 분리
레몬그라스	원료채취 → 세척, 탈수 → 스팀 5분 → 60℃, 6시간 건조 → 분쇄 → 체 내리기 → 입자별 분리
페퍼민트	원료채취 → 세척, 탈수 → 40℃, 6시간 건조 → 분쇄 → 체 내리기 → 입자별 분리
감국	원료채취 → 2% 소금물과 감초추출물에 스팀 5분 → 40℃, 5시간 건조 → 분쇄 → 입자별 분리

※ 가향처리 : 원료별 필요한 경우, 분쇄 전에 90℃에서 10~20분간 소재별로 가향 처리함

② 기억력개선 블렌딩차 소재 전처리 방법

재 료	베이스녹차와 부재료 전처리 내용
베이스녹차	증제차 제조공정에 따라 제조 (봄차 100)
은행잎	원료채취 → 세척, 탈수 → 스팀 5분 → 60℃, 6시간 건조 → 절단, 분쇄 → 체 내리기 → 입자별 분리
비파잎	원료채취 → 세척, 탈수 → 스팀 5분 → 60℃, 6시간 건조 → 절단, 분쇄 → 체 내리기 → 입자별 분리
구기자	원료채취 → 60℃, 12시간 건조 → 150℃, 뒤움 5분 → 절단, 분쇄 → 체 내리기 → 입자별 분리
페퍼민트	원료채취 → 세척, 탈수 → 40℃, 6시간 건조 → 절단, 분쇄 → 체 내리기 → 입자별 분리
목련꽃잎	원료채취 → 40℃ 이하 건조 5시간 건조 → 절단, 분쇄 → 체 내리기 → 입자별 분리

※ 가향처리 : 원료별 필요한 경우, 분쇄 전에 90℃에서 10~20분간 소재별로 가향 처리함
 ③ 면역력증진 블렌딩차 소재 처리방법

재 료	베이스녹차와 부재료 전처리 내용
베이스녹차	증제차 제조공정에 따라 제조 (봄차:가을차 50:50)
유자	원료채취→세척, 탈수 → 40℃, 12시간 건조 → 분쇄 → 체 내리기→ 입자별 분리
표고버섯	원료채취→세척, 탈수→ 절단(세절)→ 60℃, 6시간 건조 → 분쇄→ 체 내리기→ 입자별 분리
생강	원료채취→ 세척, 탈수→ 스팀 5분 → 절단 → 60℃, 12시간 건조 → 분쇄→ 체 내리기 → 입자별 분리

※ 가향처리 : 원료별 필요한 경우, 분쇄 전에 90℃에서 10~20분간 소재별로 가향 처리함

(다). 기능성별 베이스녹차 및 부재료 소재 배합비율 결정

- ① 항산화성차 : 녹차 80 + 대나무잎 7 + 레몬그라스 5 + 페퍼민트 5 + 감국 3등 4처리
- ② 기억력개선차 : 녹차50 + 은행잎20 + 비파잎15 + 페퍼민트5 + 구기자 5 + 목련꽃잎 5 등 4처리
- ③ 면역력증진차 : 녹차 80 + 표고버섯 7 + 생강 10 + 유자 5 등 4처리

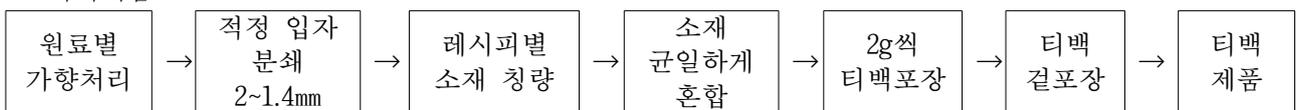
다음과 같은 기능성별, 혼합비율별 블렌딩차의 레시피 배합비율 결정은 2차년도 결과와 최종적으로 관능평가, 건강기능 식품원료, 소재의 맛의 조화, 소재에 대한 소비자 인지도 및 항산화성 등을 조사하여 결정하였다.

(3)-2 신개념 포장기술 적용 블렌딩차 시제품 제조

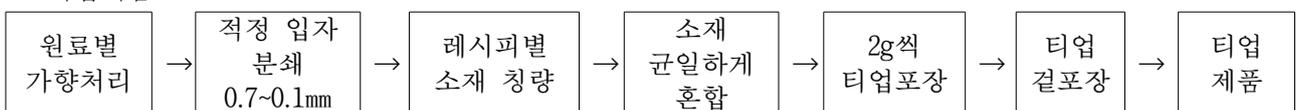
신개념 포장기술을 적용한 블렌딩차 시제품 제조는 기능성별 선호 블렌딩차 레시피 원료배합비 구명에서 선정된 기능성별 블렌딩녹차 원료 및 배합비율 적용하여 시제품으로 티백, 티업, 캡슐포장 등 3종을 제조하였다.

(가). 블렌딩차 다양한 포장방법별(티백, 티업, 캡슐) 제품 제조공정

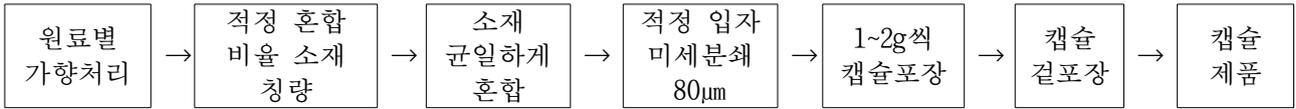
- 티백제품



- 티업제품



- 캡슐제품



제조한 블렌딩차 제품은 포장방법별 소비자 선호도조사(n=61), 카페업소 제품선호도 조사를 각각 실시하였다.

다. 연구개발 추진체계

라. 연구개발 추진일정

2. 연구내용 및 연구결과

: 블렌딩녹차 대량생산 제조공정 및 소비자 선호 블렌딩차 레시피 개발

2-1. 블렌딩녹차 차베이스 기준설정 <1차년도>

가. 블렌딩 베이스녹차 기준설정을 위한 보성산 녹차 품질평가

(1) 수확시기별 블렌딩용 베이스녹차 성분분석 및 관능평가

[표 1] 수확시기별 녹차 및 블렌딩 베이스녹차 성분분석

시기별 차종류	총질소(%)	총아미노산(%)	탄닌(%)	카페인(%)
봄차(5월 초)	4.78±0.01	1.77±0.05	15.01±0.06	2.96±0.02
여름차(7월 초)	4.56±0.02	1.47±0.03	15.34±0.05	2.85±0.00
가을차(9월 초)	3.96±0.02	1.12±0.02	11.80±0.05	2.08±0.00
봄차:여름차=50:50	4.68±0.00	1.61±0.03	15.19±0.03	2.91±0.01
봄차:가을차=50:50	4.37±0.01	1.44±0.02	13.50±0.03	2.54±0.02
여름차:가을차=50:50	4.27±0.01	1.32±0.02	13.65±0.07	2.51±0.01
여름차:가을차=25:75	4.11±0.01	1.22±0.02	12.76±0.06	2.30±0.01
여름차:가을차=75:25	4.41±0.01	1.35±0.05	14.58±0.18	2.67±0.02

[표 2] 시기별 녹차 및 블렌딩 베이스녹차의 색도

시기별 차종류	명도 L값	녹색도 -a값	황색도 b값
봄차(5월 초)	46.60±0.14	-5.65±0.09	13.24±0.14
여름차(7월 초)	47.52±0.11	-5.96±0.02	14.27±0.09
가을차(9월 초)	46.61±0.17	-4.45±0.04	14.69±0.16
봄차:여름차=50:50	47.10±0.09	-5.86±0.06	13.95±0.12
봄차:가을차=50:50	46.48±0.02	-4.95±0.02	13.95±0.05
여름차:가을차=50:50	46.84±0.08	-5.08±0.03	14.20±0.08
여름차:가을차=25:75	46.69±0.11	-4.77±0.04	14.49±0.11
여름차:가을차=75:25	47.01±0.11	-5.43±0.05	14.06±0.05

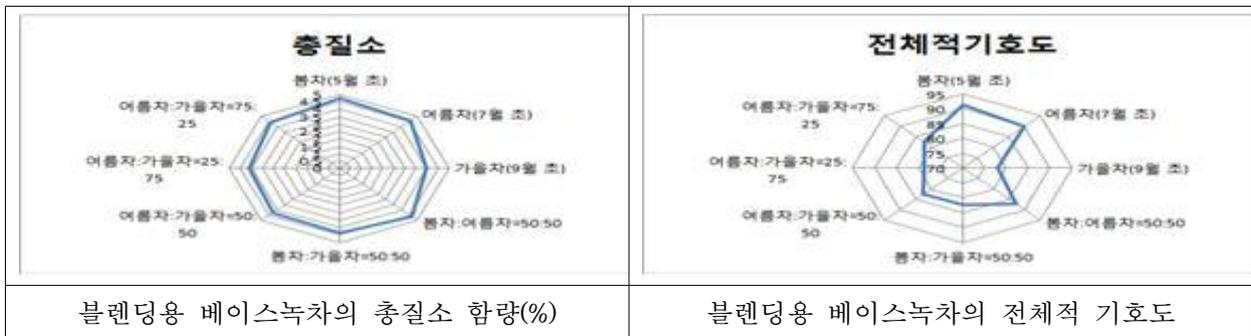
[표 3] 시기별 녹차 및 블렌딩 베이스녹차 관능평가에 의한 기호도

시기별 차종류	외형 (20)	차물색 (15)	향기 (25)	맛 (30)	우려낸 잎 (10)	총점수 (100)
봄차(5월 초)	17.92±0.91	13.68±0.69	22.85±1.20	27.69±1.52	9.18±0.45	91.32±3.33
여름차(7월 초)	17.00±1.32	13.71±0.85	22.78±0.05	27.45±1.12	8.98±0.50	89.92±2.71
가을차(9월 초)	14.68±2.77	12.36±0.88	19.38±2.09	24.00±1.51	7.57±1.04	77.99±7.37
봄차:여름차=50:50	17.42±0.71	13.46±0.78	21.88±2.11	26.37±1.73	8.11±0.97	87.23±4.91
봄차:가을차=50:50	15.56±2.25	12.51±1.13	20.83±1.93	25.59±0.93	7.96±0.71	82.45±5.72
여름차:가을차=50:50	15.66±1.91	12.63±1.01	20.70±1.71	25.53±1.04	7.98±0.67	82.50±4.96
여름차:가을차=25:75	14.84±2.40	11.91±0.83	19.48±2.08	24.72±1.00	7.57±0.72	78.52±5.77
여름차:가을차=75:25	15.44±2.50	12.54±1.17	21.25±1.63	25.05±1.70	8.11±0.56	82.39±5.77

* 한국차품질기준설정위원회 품질평가 항목 및 배점 준수 차전문가집단에 의한 관능평가, N=10, Mean±SD



[그림 1] 시기별 녹차 3종 및 블렌딩 베이스녹차 5종



[그림 2] 블렌딩용 베이스녹차의 총질소 및 전체적 기호도



시기별 녹차 및 블렌딩 베이스녹차 시료 8종

차 전문가에 의한 시료 8종 관능평가 실시

[그림 3] 시기별 녹차 및 블렌딩 베이스녹차 관능평가 실시

수확시기별 블렌딩용 베이스차로 봄녹차, 여름녹차, 가을녹차의 품질을 평가하기 위해 총질소, 총아미노산, 탄닌, 카페인을 분석한 결과, 이들 주요 성분들이 봄차에서 높았지만, 여름차, 가을차로 갈수록 함량은 낮아졌다. 이들을 혼합하여 봄차:여름차 50:50, 봄차:가을차 50:50, 여름차:가을차 50:50, 여름차:가을차 25:75, 여름차:가을차 75:25로 혼합했을 때 균일하게 총질소 및 총아미노산, 탄닌 등 주요성분이 균일해짐을 확인하였고, 수확시기별 녹차의 품질기준은 총질소 함량(%)으로 봄녹차는 5.00 ± 0.25 , 여름녹차 4.50 ± 0.25 , 가을녹차 4.00 ± 0.25 로 설정하였으며, 차 전문가집단에 의한 관능평가에서 봄녹차 91.32 ± 3.33 , 여름녹차 89.92 ± 2.71 , 가을녹차 77.99 ± 7.37 의 총점을 나타냈다.

베이스녹차의 기호도 향상을 위해서 티와티 블렌딩하여 기호도를 높이려고 하였다. 봄차는 맛과 향기 등 총점수가 91.3이였으며, 봄차:여름차 50:50, 봄차:가을차 50:50, 여름차:가을차 50:50, 또는 여름차:가을차 75:25로 블렌딩하였을 때 기호도가 82점 이상이였으므로, 균일하게 기호도를 높일 수 있었다. 손의 블렌딩을 통한 차의 품질 및 기능 향상에 관한 연구(2016)에서 블렌딩의 목적은 크게 두 가지로 하나는 차를 기반으로 조화로운 브랜드를 창조하는 것이며, 또 하나는 수확의 환경이나 제다조건이 달라질 수 있지만 고객이 기억하고 요구하는 제품의 한결같은 맛과 향을 유지시키는 것이라고 할 수 있다고 보고하였다. 이에 수확시기별 녹차를 블렌딩하여 베이스 차를 대량생산하는데 있어 일정 비율별로 혼합하여 품질이 균일한 베이스 차를 생산할 수 있을 것으로 판단되었다.

가. 국내외 시중 블렌딩녹차 제품 성분분석 및 관능평가 결과

[표 4] 한국차품질평가위원의 기준 및 배점에 의한 녹차의 관능평가표

녹차 관능평가 항목	외형	차물색	향기	맛	우려낸 잎	총점수
	형태, 색택	색도, 명도, 탁도	향의 질량, 순수성, 고저, 지속성, 종류	진한 정도, 맛의 깊이, 감칠맛 정도	여린 정도, 균일한 정도, 색택	
가 중 치	20	15	25	30	10	100

[표 5] 국내외 시중 블렌딩 녹차 제품 시료 이력

제품 ID	G제품	S제품	K제품	R제품	W제품
생산지역	일본녹차	중국녹차	보성녹차	하동녹차	제주녹차
제조 및 판매원	타바론코리아	타바론코리아	영농조합 보성제다	마더팜	오솔록
제품명	Genmaicha	Summer greentea	상쾌한 미풍	시크릿 루비	웨딩그린티
주원료	현미55+녹차45	녹차96+ 천연살구향3%, 해바라기꽃잎1%	녹차, 서양박하, 라벤더	녹차, 히비스커스+ 산사열매	스위트부켓향+ 마리골드+장미꽃 잎+콘플라워
제품특성	구수하고 깔끔한 현미녹차 전연령층 선호	살구향녹차 여성층 선호	상쾌한 느낌 진정작용 남성층 선호	히비스커스 붉은빛 신맛, 아이스티에 어울림	달콤한 꽃향기 20-30대 여성층 선호

(1) 국내외 시중 블렌딩녹차 제품 성분분석 및 관능평가

[표 6] 국내외 시중 블렌딩녹차 제품 성분분석

국내외 시중 블렌딩녹차 제품	총질소(%)	총아미노산(%)	탄닌(%)	카페인(%)
일본녹차 - G제품	2.84±0.06*	1.73±0.02	8.82±0.09	1.25±0.03
중국녹차 - S제품	4.54±0.01	2.62±0.02	10.61±0.07	2.71±0.01
보성녹차 - K제품	4.53±0.00	1.99±0.01	11.16±0.03	2.57±0.02
하동녹차 - R제품	4.52±0.02	2.76±0.02	9.11±0.04	3.06±0.03
제주녹차 - W제품	4.84±0.02	1.96±0.02	13.84±0.05	2.96±0.02

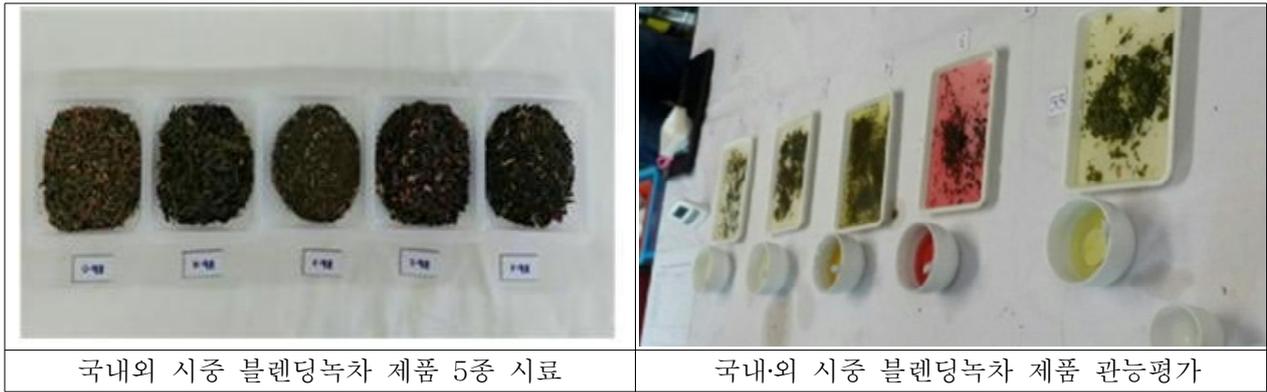
[표 7] 시기별 녹차 및 블렌딩 베이스녹차의 색도

국내외 시중 블렌딩녹차 제품	명도 L값	녹색도 -a값	황색도 b값
일본녹차 - G제품	49.14±0.05	-5.45±0.16	14.17±0.30
중국녹차 - S제품	47.45±0.14	-4.98±0.09	11.76±0.15
보성녹차 - K제품	44.60±0.04	-2.27±0.05	11.63±0.06
하동녹차 - R제품	39.28±0.21	8.09±0.40	7.54±0.07
제주녹차 - W제품	45.73±0.16	-6.84±0.04	12.51±0.14

[표 8] 국내외 시중 블렌딩녹차 제품 관능평가에 의한 기호도

국내외 시중 블렌딩녹차 제품	외형 (20)	차물색 (15)	향기 (25)	맛 (30)	우려낸 잎 (10)	총점수 (100)
일본녹차 - G제품	17.50±1.35	12.75±1.50	22.08±1.05	25.74±2.18	8.44±0.93	86.51±5.63
중국녹차 - S제품	16.08±1.98	12.29±1.22	22.68±1.21	24.87±3.67	8.18±0.83	84.09±7.36
보성녹차 - K제품	15.30±2.28	11.70±1.37	21.05±1.63	25.11±2.17	7.62±1.09	80.78±6.58
하동녹차 - R제품	17.52±1.05	12.99±0.78	21.30±1.25	25.41±1.33	8.57±0.62	85.79±3.01
제주녹차 - W제품	18.26±1.25	13.17±1.06	21.83±1.62	25.56±1.86	8.67±0.60	87.49±5.17

* 한국차품질기준설정위원회 품질평가 항목 및 배점 준수 차전문가집단에 의한 관능평가, N=10, Mean±SD



[그림 4] 국내외 시중 블렌딩녹차 제품과 관능평가 실시

국내·외 시중 판매 유통되고 있는 일본녹차, 중국녹차, 보성녹차, 하동녹차 제주녹차의 블렌딩녹차 5 제품에 대한 품질평가로 성분에서는 블렌딩 혼합 소재의 영향을 받아서 총질소 함량이 기호도에 영향을 미치는 경향은 나타나지 않았으며, 관능평가에 의한 전체적 기호도는 제주녹차 W-제품, 일본녹차 G-제품, 하동녹차 R-제품, 중국녹차 S-제품, 보성녹차 K-제품 순으로 높은 기호도를 나타냈다. 보성녹차에 대한 기호도에서 향기나, 맛의 기호도는 비교적 좋은 편이었으나, 외형, 찻물색 우려낸 앞에서 낮은 기호도를 나타내 최종 제일 낮은 기호도를 나타냈다. 이는 차를 평가하는 항목에 맛과 향기가 중요하지만, 외형과 우려낸 앞의 상태로 원료에 대한 낮은 평가로 이를 개선하고 소비자가 요구하는 기호도 높은 블렌딩차 제품 개발이 요구되었다.

차 성분분석 결과는 다른 부재료가 혼합되어 품질 평가에 일관성 있는 결과를 얻지 못해 이용할 수 없었다. 소비자 인지에 의한 녹차 품질평가 요소의 계층적 중요도 설정에서 박 등 (2011)은 국산 녹차에 대한 품질 평가 기준을 소비자 입장에서 검토하기 위해 전문가들이 설정해 놓은 녹차 품질평가 방법 중 이미 제시된 5가지 품질평가 요소 중에서 맛, 향, 찻물색, 마른 찻잎의 외형, 우려낸 찻잎의 형상 순으로 나타났다. 녹차의 품질을 평가할 때 527명의 설문 응답자들은 차 음용 특성 중 차를 마시는 이유는 건강에 좋기 때문이 29.5%로 가장 높았으며, 정서 안정에 도움 17.8%, 향이 좋아서 13.7%, 맛이 좋아서 13.4%, 습관적으로 10.6%, 미용/다이어트에 도움이 되기 때문에 7.5%로 었다. 차를 구매할 때 고려하는 구입특성요소의 중요도는 차 품질을 0.248 가장 중요하게, 그다음 가격(0.236), 브랜드(0.224), 채엽시기(0.167), 디자인(0.124) 순으로 중요하게 고려하여 구매하는 것으로 나타나 이들을 고려하여 본 과제의 2차년, 3차년 연구개발을 추진하고자 하였다.

2-2. 블렌딩녹차 대량생산 제조공정 정립 및 원료표준화 <2차년도>

가. 수확시기별 베이스차 원료표준화를 위한 대량생산(10kg) 제조공정 구명

(1) 보성지역 업체별 및 녹차 제다공정

[표 1] 보성지역 업체별 증제녹차 제조공정

제다공정별	업체별 처리량	찾잎 수확	증열	냉각, 엽타기	조유 (租柔)	비비기 (柔捻)	중유(中柔)	재건기 정유(精柔)	건조
	B업체 (65kg)×3라인	손수확 기계수확	증열기에서 60초	90℃ /열풍 15분	80℃~50℃ 28분내 순차적으로	15분	50℃ 열풍 /20분	60℃ 열풍 /20분	90℃ /40분
증제차 65~35kg	N업체 (35kg)	손수확 기계수확	증열기에서 100℃/45초	선풍기로 냉각	96℃/40분 비비고 풀어줌	5분	40℃ 열풍 /40분	100℃ 40분, 형상을 잡아줌	90℃/ 40분 *수분함량 4~5%
	D업체 (60kg)×3라인	손수확 기계수확	증열기에서 100℃/1분	냉풍으로 1분간	70~75℃ /20분	5분	40~45℃ /20분 배기구40℃	50℃/20분	110℃ /15분

[표 2] 보성지역 업체별 덩음녹차 제조공정

제다공정별	업체별	찾잎 수확	살청	냉각	비비기	풀어주기	건조	비비기	건조	건조
	B업체 10kg	손 수확 기계수확	210℃/ 7분 1/2로 나눠서	선풍기로 식히기 (실온까지)	실온 /20분	풀어 주기	건조기내연속 90℃/1시간	-	-	100℃/ 40분 마무리
덩음차 10kg	N업체 10kg	손 수확 기계수확	210℃ /12분 (1/2)	선풍기로 식히기	실온 /15분	풀어 주기	180℃/ 10분 식히기 풀어주기	-	150℃ /10분 식히기 풀어주기	건조 최종 수분 함량
	D업체 10kg	손 수확 기계수확	300-250℃ /5분 (1/2)	선풍기로 식히기	실온 /10분	식히기 풀어 주기	200~220℃ /5분간	2차 유념 5분	120~130℃ 1시간	4~5%

소비자 요구에 부응하는 블렌딩(혼합)차 개발로 차 소비 확대에 대한 연구개발에 고객이 기억하고 요구하는 균일화된 블렌딩차의 품질 유지 기술이 필요하다.

보성지역에는 보성녹차생산자조합, 대한다업, 보성제다, 운림다원, 신옥로, 다도락, 보성농협, 녹차마을영농조합법인, 차산업연구소 등 10여 개의 대량생산 가능한 기계 자동화 제다시설을 보유하고 있는데, 이들이 생산하고 있는 보성산 녹차를 베이스차를 이용해서 기호성 및 기능성을 부여한 다양한 블렌딩차를 개발하고 상품화하고자 먼저, 수확시기별로 이들 차 재배 및 가공농가에서 증제차와 덩음차 생산이 가능한 곳 3개소를 선발하여 현재 생산하고 있는 제다 방법을 조사하여 [표 1]과 [표 2]에 나타냈다. 증제차 제조공정은 증열-냉각-엽타기-조유-비비기-중유-정유-건조 순서로 제조하였고, 덩음차 제조공정은 살청-냉각-비비기-풀어주기-건조-비비기-건조-식히기-건조 순서로 하여 최종 녹차 제품의 수분함량은 4~5%가 될 때까지 건조하였다.

(2) 수확시기별, 제다공정별 및 업체별 베이스녹차 주요 성분분석 및 관능평가

[표 3] 수확시기별, 제다공정별 및 업체별 녹차의 주요성분 분석결과

찾잎 수확시기별	제다 공정별	업체별	총질소(%) ¹⁾		총아미노산(%)		탄닌(%)		총페놀 (mg/g)	플라보노이드 (mg/g)
			NIR	킬달 분석	NIR	비색 정량	NIR	비색정량		
봄차 (5월 초)	중제차	B업체	4.32	3.67	1.71	1.42	13.20	7.63	54.48	29.26
		N업체	4.90	3.98	2.29	2.73	11.86	6.26	47.53	25.28
		D업체	5.06	4.32	2.23	1.91	14.74	9.95	65.92	30.21
	뒤음차	B업체	4.51	3.54	1.82	1.31	13.22	8.07	53.95	32.14
		N업체	5.58	5.12	2.89	3.34	13.07	8.75	56.95	26.52
		D업체	4.10	3.12	1.07	1.89	14.99	9.77	66.10	34.19
여름차 (7월 초)	중제차	B업체	4.55	3.98	1.39	1.84	14.01	9.22	59.56	28.40
		N업체	4.50	3.98	1.59	1.59	13.44	8.46	55.81	26.28
		D업체	3.62	2.65	0.73	0.93	12.26	7.66	55.93	29.63
	뒤음차	B업체	4.73	3.89	1.60	1.81	14.10	9.23	59.99	26.74
		N업체	4.56	3.70	1.75	1.58	13.87	8.76	56.98	28.23
		D업체	4.15	3.93	1.10	1.19	13.81	8.68	57.70	31.26
가을차 (9월 초)	중제차	B업체	4.03	3.08	0.81	1.64	10.70	4.22	50.98	20.54
		N업체	5.26	4.69	5.52	4.12	13.53	6.44	62.25	22.34
		D업체	4.89	4.28	2.21	1.83	12.66	5.51	56.88	21.34
	뒤음차	B업체	3.61	2.83	0.60	1.90	13.30	5.59	59.32	21.93
		N업체	5.32	4.83	2.48	3.03	13.45	6.09	59.17	23.19
		D업체	5.17	4.60	2.21	2.13	13.85	6.03	58.51	26.49

¹⁾ 총질소함량(%):2017년 연구결과로 품질기준 설정 (봄녹차:5.00±0.25, 여름녹차:4.50±0.25 가을녹차:4.00±0.25)

수확시기별(봄, 여름, 가을), 제다방법별(중제, 뒤음), 및 업체별(B, N, D)로 녹차의 성분분석 결과는 [표 3]과 같이 총질소, 총아미노산, 탄닌, 총페놀, 플라보노이드의 함량은 제다방법별로는 중제차보다는 뒤음차 성분이 더 높게 나타났다. 1년차 연구결과 녹차의 품질기준은 총질소 함량(%)으로 봄녹차는 5.00±0.25, 여름녹차 4.50±0.25, 가을녹차 4.00±0.25로 설정하였는데, 이 범위를 벗어나는 차는 베이스녹차를 제조하는데 제외시켰으며, 다음은 대량생산을 위해 다양한 혼합 비율별로 베이스녹차를 제조하고자 하였다.

[표 4] 수확시기별, 제다공정별 베이스녹차의 차 전문가집단에 의한 관능평가

차잎 수확시기별	제다 공정별	업체별	외형 (20%)	차물색 (15%)	향 (25%)	맛 (30%)	우려낸잎 (10%)	전체적 기호도 (평균점 100점)
봄차 (5월 중순)	증제차	B업체	11.60	7.65	19.00	22.20	6.80	67.25
		N업체	11.80	9.75	19.50	21.30	6.90	69.25
	D업체	11.80	9.30	19.00	23.10	7.30	70.50	
		B업체	12.40	9.90	15.50	20.40	6.80	65.00
	뒤음차	N업체	11.80	10.95	16.00	18.60	6.90	64.25
		D업체	11.20	12.30	17.00	18.90	6.00	65.40
여름차 (7월 초)	증제차	B업체	12.00	9.75	19.75	23.70	6.40	71.60
		N업체	13.60	11.25	19.75	22.20	6.90	73.70
	D업체	11.20	11.25	15.25	17.40	6.30	61.40	
		B업체	13.00	9.15	19.25	22.80	6.80	71.00
	뒤음차	N업체	11.00	10.65	19.25	21.90	6.80	69.60
		D업체	10.20	11.55	16.00	17.10	6.40	61.25
가을차 (9월 초)	증제차	B업체	7.80	12.15	17.25	20.10	5.20	62.50
		N업체	13.40	10.95	19.75	21.90	7.00	73.00
	D업체	11.20	10.35	18.50	19.20	6.60	65.85	
		B업체	7.80	11.25	17.25	19.80	4.80	60.90
	뒤음차	N업체	13.00	9.87	19.25	20.10	6.60	68.82
		D업체	13.00	9.30	17.00	18.60	6.80	64.70

* 한국차품질기준설정위원회 품질평가 항목 및 배점 준수 차전문가 집단에 의한 관능평가, N=5, Mean±SD

수확시기별, 제다방법별 및 업체별로 녹차의 한국차품질기준설정위원회 품질평가 항목 및 배점에 준수하여 차전문가 집단에 의한 관능평가를 실시한 결과는 [표 4]와 같이 전체적으로 차의 품질에 영향을 미치는 맛과 향에서 뒤음차보다는 증제차가 더 기호도가 높았다.

이러한 주요 성분분석과 관능평가 결과를 종합하여 베이스녹차 제조시에 차 선택은 총질소 함량 (%) 봄녹차 5.00 ± 0.25 , 여름녹차 4.50 ± 0.25 , 가을녹차 4.00 ± 0.25 로 여름녹차중에 D업체의 증제차와 가을차 중에 B업체의 뒤음차 등 품질기준보다 낮은 각 시료는 베이스녹차를 제조하는데, 제외시켰다. 다음은 대량생산을 위해 다양한 혼합비율별로 베이스녹차를 제조하고자 하였다.



[그림 1] 수확시기별 제다공정별 및 업체별 베이스녹차 18종



[그림 2] 수확시기별 제다공정별 및 업체별 베이스녹차 관능평가

(3) 수확시기별, 제다공정별 베이스녹차의 주요 성분과 관능평가 결과의 상관관계

[표 5] 수확시기별, 제다공정별 베이스녹차의 주요 성분과 관능평가 결과의 상관관계

Correlation coefficient (p-value)		차물색	차물향	차물맛	전체적 기호도
총질소	NIR	-.384 (0.116)	.367 (0.134)	.236 (0.346)	.512* (0.030)
	킬달분석법	-.344 ($<.162$)	0.343 (0.163)	.156 (0.538)	.457 (0.056)
총아미노산	NIR	-.192 (0.446)	0.375 (0.125)	.236 (0.346)	.520* (0.027)
	닌히드린	-.006 (0.982)	0.342 (0.164)	.134 (0.595)	.373 (0.128)
	비색법				
탄닌	NIR	-.188 (0.455)	.177 (0.483)	.232 (0.354)	.345 (0.161)
	탄닌	-.109 (0.667)	0.019 (0.939)	.266 (0.286)	.320 (0.196)
	비색법				
총페놀		.076 (0.764)	.092 (0.716)	.101 (0.690)	.199 (0.428)
플라보노이드		-.087 (0.731)	-.339 (0.169)	-.069 (0.786)	-.056 (0.827)

* 상관계수 : $-1 < r < 1$ (* $p < 0.05$), N=18

차의 주요 성분분석 결과와 관능평가에 대한 상관관계를 분석한 결과 총질소 및 총아미노산 함량과 전체적인 기호도에서 신뢰도 5% 수준에서 유의적인 상관관계를 나타냈다.

(4) 블렌딩녹차 제품화를 위한 베이스녹차 혼합비율별 블렌딩베이스녹차 제조

[표 6] 블렌딩녹차 제품화를 위한 베이스녹차 혼합비율별 블렌딩베이스 녹차

시 기 별 녹차	봄차	여름차	가을차	봄차+ 여름차	봄차+ 가을차	여름차+ 가을차	여름차+ 가을차	여름차+ 가을차	봄차+ 여름차+ 가을차	봄차+ 여름차+ 가을차
혼합비율	100	100	100	50:50	50:50	50:50	25:75	75:25	10:20:70	10:40:50
증제차	①-1	②-1	③-1	④-1	⑤-1	⑥-1	⑦-1	⑧-1	⑨-1	⑩-1
뒤음차	①-2	②-2	③-2	④-2	⑤-2	⑥-2	⑦-2	⑧-2	⑨-2	⑩-2

블렌딩녹차 제품 개발을 위해 베이스녹차를 균일하게 대량생산을 위한 블렌딩 기술이 요구됨에 따라서 증제차 및 뒤음차 제조방법별로 봄, 여름, 가을 수확시기별 제조한 블렌딩베이스차를 일정비율별로 혼합하여 10종을 제조하였다.

(5) 베이스녹차 혼합비율별 블렌딩베이스녹차 주요성분 및 관능평가

[표 7] 수확시기별, 블렌딩비율별 및 제다공정별 베이스녹차 주요성분

시기별 및 블렌딩 비율별	제다 방법별	총질소(%) ¹⁾		총아미노산(%)		탄닌(%)		녹색도 ²⁾ G값 (a/b*100)
		NIR	킬달 분석법	NIR	비색 정량	NIR	비색정량	
봄 차 (100)	증제차	4.59	3.66	1.97	2.46	12.55	5.02	56.90
	뒤음차	5.05	4.40	2.33	2.25	13.15	4.76	51.00
여름 차 (100)	증제차	4.64	3.49	1.54	2.22	14.01	6.41	55.57
	뒤음차	4.71	3.72	1.73	2.14	14.21	4.33	49.09
가을 차 (100)	증제차	4.68	3.69	1.58	3.38	12.12	5.50	53.91
	뒤음차	4.42	3.57	1.47	1.77	13.44	4.43	46.01
봄차:여름차 (50:50)	증제차	4.59	3.57	1.72	2.47	13.35	5.73	58.87
	뒤음차	4.88	4.04	2.04	1.89	13.68	4.46	51.84
봄 차:가을 차 (50:50)	증제차	4.65	3.87	1.76	3.07	12.41	5.48	54.17
	뒤음차	4.74	3.89	1.94	2.29	13.34	4.46	49.11
여름 차:가을 차 (50:50)	증제차	4.64	3.47	1.55	2.60	13.09	6.12	54.45
	뒤음차	4.78	3.97	1.92	2.15	13.30	4.46	48.10
여름 차:가을 차 (75:25)	증제차	4.61	3.72	1.55	2.79	12.55	5.60	54.67
	뒤음차	4.56	3.67	1.62	2.07	13.59	4.53	48.94
여름 차:가을 차 (25:75)	증제차	4.68	3.89	1.59	2.40	13.50	6.11	53.29
	뒤음차	4.63	3.88	1.64	2.00	13.92	4.40	49.37
봄차:여름차:가을차 (10:20:70)	증제차	4.65	3.92	1.64	2.80	12.55	5.49	54.10
	뒤음차	4.59	3.83	1.65	1.76	13.56	4.98	46.62
봄차:여름차:가을차 (10:40:50)	증제차	4.62	3.82	1.60	2.60	12.80	5.63	54.57
	뒤음차	4.63	3.86	1.68	2.29	13.70	4.23	49.50

¹⁾ 총질소(% 함량)에 의한 품질기준에서 봄녹차:5.00±0.25, 여름녹차:4.50±0.25 가을녹차:4.00±0.25

²⁾ G값(녹색도)는 50이상일때 품질이 우수한것으로판단(농촌진흥청 온난화대응농업연구조사체)

수확시기별, 블렌딩비율별, 제다공정별 베이스녹차 20종 모두 기준치를 넘는 값을 나타냈으며, 차의 제조공정에서 증제차가 뒤음차 보다 G값이 전체적으로 모두 높았다. 이는 블렌딩차 베이스녹차 대량생산 제조시에 베이스녹차 품질기준으로 총질소 함량 4.74~4.47%, 총아미노산 함량 2.15~1.63%로 설정하였다.

[표 8] 수확시기별, 블렌딩비율별 및 제다공정별 베이스녹차의 카테킨류 함량

시기별 및 블렌딩비율별	제다 방법별	EGC ¹⁾ (mg/g)	C ²⁾ (mg/g)	EC ³⁾ (mg/g)	EGCG ⁴⁾ (mg/g)	ECCG ⁵⁾ (mg/g)	CG ⁶⁾ (mg/g)	합계 (mg/g)
봄 차 (100)	증제 차	0.37	0.87	5.91	20.70	7.72	0.22	38.11
	뒤음 차	0.12	0.92	5.65	23.27	9.60	0.34	43.49
여름 차 (100)	증제 차	0.18	1.10	5.73	30.14	10.22	0.29	50.26
	뒤음 차	0.08	0.93	5.26	29.68	6.90	0.18	46.23
가을 차 (100)	증제 차	0.17	0.82	5.42	18.20	6.63	0.17	33.81
	뒤음 차	0.44	0.85	5.55	23.97	8.55	0.21	42.76
봄차:여름차 (50:50)	증제 차	0.20	0.94	5.77	25.37	8.71	0.26	43.64
	뒤음 차	0.08	0.90	5.56	27.13	9.86	0.29	47.18
봄 차:가을 차 (50:50)	증제 차	0.16	0.89	5.49	19.05	6.56	0.21	34.64
	뒤음 차	0.12	0.81	4.39	23.47	8.85	0.24	41.07
여름 차:가을 차 (50:50)	증제 차	0.16	1.00	5.78	26.03	9.02	0.23	44.85
	뒤음 차	0.08	0.81	5.58	23.59	8.93	0.25	42.48
여름 차:가을 차 (75:25)	증제 차	0.20	0.97	5.73	22.66	8.05	0.20	40.35
	뒤음 차	0.38	0.79	4.78	24.21	8.37	0.21	41.75
여름 차:가을 차 (25:75)	증제 차	0.17	1.04	5.76	27.81	9.62	0.26	47.25
	뒤음 차	0.40	0.92	5.37	25.62	8.61	0.24	43.99
봄차:여름차:가을차 (10:20:70)	증제 차	0.13	0.97	4.21	21.98	7.84	0.20	37.79
	뒤음 차	0.63	0.81	5.49	24.31	8.51	0.22	43.13
봄차:여름차:가을차 (10:40:50)	증제 차	0.39	0.87	5.65	24.23	8.33	0.22	42.23
	뒤음 차	0.13	0.79	5.66	26.22	9.13	0.23	45.29

¹⁾ EGC: : epigallocatechin ²⁾C : catechin ³⁾EC : epicatechin ⁴⁾ EGCG : Epigallocatechingallate
⁵⁾ ECCG: epicatechingallate ⁶⁾ CG : catechingallate

수확시기별, 블렌딩비율별 및 제다공정별 베이스녹차 20의 녹차에 함유된 카테킨류 6종을 분석한 결과, 전체적으로 33.81~47.25mg/g 함유하나 제다공정별 일관된 경향을 나타내지는 않았다.

[표 9] 수확시기별, 블렌딩비율별 및 제다공정별 베이스녹차의 카페인, 환원당, 비타민 C 함량

시기별 및 블렌딩비율별	제다 방법별	Caffein ¹⁾ (mg/g)	Gallic acid ²⁾ (mg/g)	환원당 ³⁾ (mg/g)	비타민 C ⁴⁾ mg%(NIR)
봄 차 (100)	증제 차	15.38	2.33	93.53	264.72
	뒤음 차	18.49	3.58	119.77	252.17
여름 차 (100)	증제 차	19.24	2.61	144.90	247.47
	뒤음 차	19.33	3.19	160.42	240.21
가을 차 (100)	증제 차	17.04	2.38	100.55	260.02
	뒤음 차	17.16	3.21	131.97	259.02
봄차:여름차 (50:50)	증제 차	16.65	2.38	141.94	253.41
	뒤음 차	19.00	3.35	142.31	246.14
봄 차 :가을 차 (50:50)	증제 차	16.10	2.29	123.10	260.66
	뒤음 차	17.83	3.19	145.27	253.52
여름 차 :가을 차 (50:50)	증제 차	19.22	2.63	140.84	253.82
	뒤음 차	18.13	3.24	150.81	256.21
여름 차 :가을 차 (75:25)	증제 차	18.76	2.55	110.16	257.34
	뒤음 차	16.97	3.01	143.79	250.51
여름 차 :가을 차 (25:75)	증제 차	19.12	2.60	138.62	251.51
	뒤음 차	16.78	2.84	156.73	243.81
봄차:여름차:가을차 (10:20:70)	증제 차	17.71	2.46	112.01	260.19
	뒤음 차	17.20	3.15	130.12	254.41
봄차:여름차:가을차 (10:40:50)	증제 차	18.41	2.55	126.79	262.77
	뒤음 차	18.34	3.12	152.66	248.16

1) 2) HPLC분석법에 의해 측정됨, 3) DNS 비색법, 4) NIR(nearinfrared spectrophotometer)분석

수확시기별 블렌딩비율별 및 제다공정별 베이스녹차 20종에 대한 쓴맛성분 카페인과 갈릭산은 제다방법에서 뒤음차가 높았고, 수확시기별로는 여름차가 높았으며, 단맛의 환원당도 뒤음차가 시기별로는 여름차가 높았으며, 신맛의 비타민 C 함량은 제다방법별로는 증제차가 시기별로는 가을차가 높았다.

[표 10] 수확시기별, 블렌딩비율별 및 제다공정별 베이스녹차의 관능평가

시기별 및 블렌딩비율별	제다 방법별	차물색 (20%)	향 (35%)	맛 (45%)	전체적 기호도 (평균 100점)
봄 차 (100)	증제차	13.2	27.6	31.1	71.9
	뒤음차	11.0	23.8	27.9	62.7
여름 차 (100)	증제차	14.8	27.3	28.8	70.9
	뒤음차	12.8	22.4	25.7	60.9
가을 차 (100)	증제차	14.8	23.1	29.3	67.2
	뒤음차	15.2	22.8	24.8	62.7
봄차:여름차 (50:50)	증제차	15.0	26.3	30.6	71.9
	뒤음차	14.8	25.9	28.8	69.5
봄 차:가을 차 (50:50)	증제차	16.0	27.0	32.4	75.4
	뒤음차	14.8	24.5	30.2	69.5
여름 차:가을 차 (50:50)	증제차	15.0	25.2	28.8	69.0
	뒤음차	14.2	23.8	27.5	65.5
여름 차:가을 차 (75:25)	증제차	16.2	25.9	32.0	74.1
	뒤음차	15.4	24.2	30.2	69.7
여름 차:가을 차 (25:75)	증제차	16.4	24.9	30.2	71.4
	뒤음차	14.4	23.8	29.3	67.5
봄차:여름차:가을차 (10:20:70)	증제차	16.4	25.2	27.9	69.5
	뒤음차	15.0	23.1	28.8	66.9
봄차:여름차:가을차 (10:40:50)	증제차	15.4	23.5	27.9	66.8
	뒤음차	14.2	23.1	29.7	67.0

* 한국차품질기준설정위원회 품질평가 항목 및 배점 준수 차전문가집단에 의한 관능평가, N=5, Mean±SD 단, 시료가 티백포장제품이라 외형, 우려낸잎에 대한 평가는 제외하였음



차 전문가집단의 증제차 10종에 대한 관능평가

차 전문가집단의 뒤음차 10종에 대한 관능평가

[그림 3] 수확시기별, 블렌딩비율별 및 제다공정별 베이스녹차 관능평가 모습

수확시기별, 블렌딩비율별 및 제다공정별 베이스녹차 20종을 한국차품질기준설정위원회의 품질평가 항목의 찻물색, 향, 맛 전체적인 기호도를 평가한 결과, 봄차와 가을차 50:50으로 혼합 블렌딩한 증제차가 75.4로 가장 높은 점수를 받았으며, 시기별로는 봄차 증제차가 71.9로 가장 높은 평가를 받았다.

그러므로 기능성 및 기호성 블렌딩녹차 제조를 위해서 베이스녹차 선정은 항산화성과 면역력증진 기능성 블렌딩녹차 제품화를 위해서 봄차:가을차 50:50의 블렌딩녹차를 설정하였고, 기억력개선을 위한 기능성 블렌딩차 제품화를 위해서는 봄차 100 를 설정하였다. 블렌딩 베이스녹차 관능적 기호도 묘사분석을 위해 20종의 베이스녹차를 사용하였다.

나. 기능성 및 기호성 블렌딩녹차 부재료 소재 스크린 및 선발

(1) 기능성 및 기호성 블렌딩녹차 소재 스크린 및 선발

[표 11] 기억력개선 소재 스크린 및 선발

소재	기억력개선 기능성 소재 문헌 스크린	선발 근거	선 발	비율 (%)
꽃류	목련꽃	1.건강기능식품원료 (식약처 등재원료) 2. 맛의 조화 3. 관능평가	봄녹차(100)	40
허브류	은행잎, 당귀		은행잎	20
지역특산물	구기자, 비파엽, 천마		비파잎	20
베이스녹차	녹차베이스		구기자	15
	봄녹차		목련꽃	5

[표 12] 면역력 증진 소재 선발

소재	면역력증진 기능성 소재 문헌 스크린	선발 근거	선 발	비율 (%)
과일류	매실, 유자, 배	1.건강기능식품원료 (식약처 등재원료) 2. 맛의 조화 3. 관능평가 4. 소비자인지도	봄차:가을차 (50:50)	30
꽃류	들국화(산국)		민들레	20
허브류	산수유, 우엉, 소엽		표고버섯	20
지역특산물	현미, 표고버섯, 생강		우엉	10
베이스녹차	녹차베이스		생강	10
			유자	10

[표 13] 항산화성 기능성 소재 선발

소재	항산화 기능성 소재 문헌 스크린	선 발 근거	선 발	비율 (%)
꽃류	감국	1.건강기능식품원료 (식약처 등재원료) 2. 맛의 조화 3. 관능평가 4. 분석결과	봄차:가을차 (50:50)	35
허브류	레몬그라스, 페퍼민트		대나무잎	35
지역특산물	현미, 양파, 연잎 대나무잎추출물, 복분자추출물		레몬그라스	16
			페퍼민트	4
베이스녹차	녹차베이스		감국	10



[그림 4] 기능성 및 기호성 블렌딩녹차 제조를 위해 선발된 소재

(2) 기능성 및 기호성 블렌딩녹차 기능성분석 및 관능평가

[표 14] 소비자 기호도 조사 시료 6종

블렌딩차 제품 6종	증제차	①-1 블렌딩차 기능성A (기억력 개선)	②-1 블렌딩차 기능성B (면역력 증진)	③-1 블렌딩차 기능성C 항산화능(노화방지)
	뒤음차	①-2 블렌딩차 기능성A (기억력 개선)	②-2 블렌딩차 기능성B (면역력 증진)	③-2 블렌딩차 기능성C 항산화능(노화방지)



[그림 5] 베이스녹차 제다방법별 및 기능성별 제조한 블렌딩녹차 6종

기능성 및 기호성 블렌딩녹차 소재 선발로 기억력개선 블렌딩녹차 제품화를 위해 봄녹차 (100), 은행잎, 비파잎, 구기자, 목련꽃을 선발하였고, 면역력 증진을 위한 블렌딩녹차 제품화를 위해 봄차:가을차(50:50), 민들레, 표고버섯, 우엉, 생강, 유자를 선발하였고, 항산화성의 기능성을 위한 블렌딩녹차 제품화를 위해 봄차:가을차(50:50), 대나무잎, 레몬그라스, 페퍼민트, 감귤을 선발하여 각각 베이스녹차를 증제차와 뒤음차로 나누어서 총 6종의 블렌딩녹차를 혼합제조하고 티백 포장하였다.

[표 15] 기능성 및 기호성 블렌딩녹차의 항산화성 및 아세틸콜린에스테라이스저해능

기능성별 블렌딩녹차	제 다 법 별 베이스녹차	항산화성 (vit C equ. mg/g)	아세틸콜린에스테라이스 저해능 (%)
항산화성차	증제차	74.6 ± 5.5	37.4 ± 0.2
	뒤음차	77.8 ± 1.4	39.5 ± 0.3
기억력 개선차	증제차	97.8 ± 3.4	46.3 ± 8.4
	뒤음차	108.2 ± 3.6	54.0 ± 1.5
면역력 증진차	증제차	61.9 ± 0.9	30.4 ± 1.9
	뒤음차	69.3 ± 3.1	35.7 ± 0.7

[표 16] 기능성 및 기호성 블렌딩녹차의 차전문가 집단의 관능평가

기능성별 블렌딩녹차	제 다 법 별 베이스녹차	외형 (20%)	차물색 (15%)	향 (25%)	맛 (30%)	우려낸잎 (10%)	전체적 기호도 (평균 100점)
항산화성차	증제차	17.0 ± 1.6	12.6 ± 1.2	21.7 ± 2.3	25.7 ± 2.5	8.7 ± 1.1	85.6 ± 7.7
	뒤음차	16.4 ± 1.5	12.3 ± 0.7	20.4 ± 1.9	25.6 ± 2.8	8.6 ± 1.1	83.2 ± 6.9
기억력 개선차	증제차	17.7 ± 1.8	12.8 ± 1.4	21.0 ± 0.9	25.6 ± 1.1	8.4 ± 0.4	86.4 ± 3.9
	뒤음차	17.3 ± 1.6	12.7 ± 1.1	20.5 ± 2.0	24.4 ± 2.2	8.4 ± 0.5	83.3 ± 7.4
면역력 증진차	증제차	16.8 ± 1.6	13.1 ± 0.9	21.5 ± 2.5	25.8 ± 2.4	8.1 ± 0.8	85.3 ± 7.4
	뒤음차	16.3 ± 1.3	12.8 ± 0.7	20.1 ± 1.6	24.0 ± 2.3	8.3 ± 0.8	81.5 ± 3.7

* 한국차품질기준설정위원회 품질평가 항목 및 배점 준수 차전문가집단에 의한 관능평가, N=7, Mean±SD

(3) 기능성 및 기호성 블렌딩녹차 6종의 소비자 기호도 조사용 티백포장 차 제조



[그림 6] 기능성 및 기호성 블렌딩녹차 티백 6종 포장

베이스녹차의 증제차, 뒤음차 제조방법별로 항산화성, 기억력개선, 면역력증진 기능성의 6종의 블렌딩녹차는 소재를 적정하게 혼합하여 부산대학교 소비자 기호도조사(N=100)용으로 이용하였다.

나. 블렌딩 베이스녹차 관능적 묘사분석 및 소비자 기호도 조사

(1) 블렌딩베이스녹차의 묘사분석

[표 17] 블렌딩베이스녹차의 묘사분석 용어 목록(Lexicon)

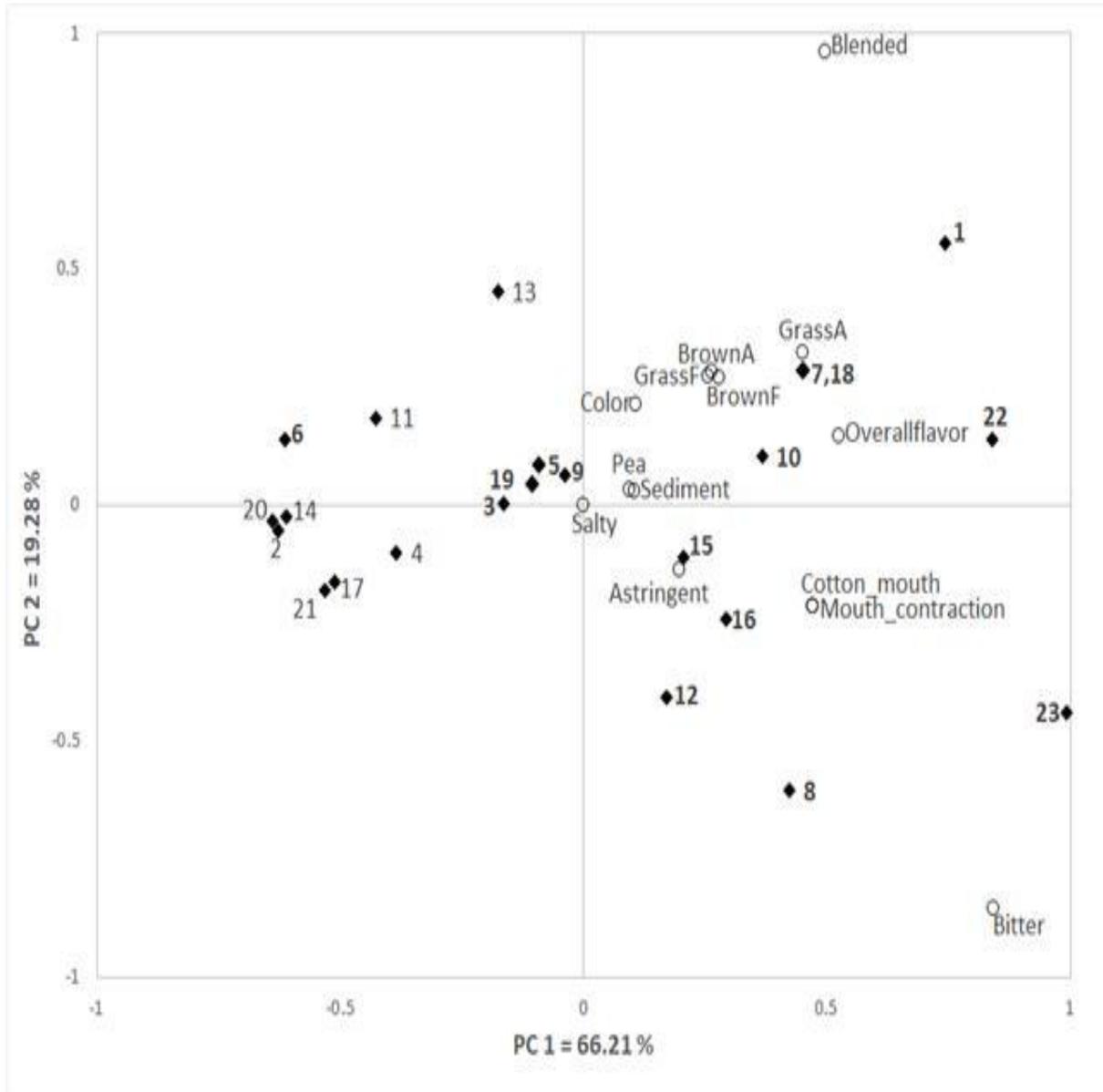
관능적 특성	정의	표준물질
외 관		
색	녹차를 흰색종이를 뒤에 받치고 보았을 때 연노란색과 연녹색의 정도	587C = 2.0 586C = 5.0
침전물	녹차를 받고 3년 정도 지났을 때의 잔여물이 가라 앉은 양의 정도	계피물 = 5.0
향 미		
전반적인 향미 강도	따뜻한 녹차를 마셨을 때 전반적인 향과 맛의 강함과 약함의 정도	현미녹차 2 = 8.0
조화로운	따뜻한 녹차를 마셨을 때 쓴맛, 떫은맛, 구수한 맛과 향이 함께 어우러져 마시기 좋고 품미가 좋은 정도	하동녹차 = 5.0
풀향	따뜻한 녹차의 냄새를 처음 맡았을 때 풀냄새의 정도	오설록녹차물 2 = 8.0
풀맛	따뜻한 녹차를 처음 맡았을 때 나는 풀맛의 정도	오설록녹차물 1 = 3.0
구수한 향	아스파라거스를 가열했을 EO 나는 구수한 향	아스파라거스 = 4.0
구수한 맛	아스라파거스를 가열했을 때 나는 구수한 맛	아스파라거스 = 3.0
완두콩	녹차를 마셨을 때 약간의 미끌거림과 물보다 짙은 농도의 느낌	완두콩통조림 = 4.0
쓴맛	카페인 용액의 쓴맛	쓴맛 용액 3.5 5.0 6.5 8.5 10.0
떫은맛	Alum 용액의 떫은맛	떫은맛 용액 1.5
짠맛	소금 용액의 짠맛	
후 미		
텃텃한	녹차를 마신 뒤에 녹차의 쓴맛과 떫은맛으로 인한 입안이 개운치 않고 매끄럽지 않은 느낌	
입안 수축감	녹차의 쓴맛과 떫은맛, 텃텃함으로 인하여 입안이 조이는 느낌의 정도	

묘사분석 결과 향미 프로파일의 훈련단계에서 개발된 용어목록 Lexicon을 [표 17]에 나타내었으며, 각 특성을 가장 잘 설명할 수 있는 참고물질을 결정하여 강도를 주고 평가의 기준으로 사용하였다. Flavor Profile의 Consensus절차를 사용한 결과는 [표 2]에 나타내었다. 이를 시각적으로 판별할 수 있도록 주성분 분석을 사용하여 [그림 7]에 나타내었다.

[표 18] 블렌딩베이스녹차의 향미 프로파일(일부 Lexicon 제외)

시기별 및 블렌딩비율별	제다 방법 별	전반적 향미 강도	조화로운	플향	플향 미	구수한향	구수한미	쓴맛	떫은맛	짠맛
봄차 (100)	증제차	6.00	7.00	3.50	2.50	2.50	2.50	5.50	1.00	0.25
	뒤음차	5.00	5.00	2.00	2.00	2.00	2.00	4.00	0.50	0.25
여름차 (100)	증제차	4.50	4.50	1.75	1.75	1.75	1.75	4.00	0.75	0.25
	뒤음차	5.00	4.50	2.50	2.00	2.00	2.00	6.00	1.00	0.25
가을차 (100)	증제차	5.00	5.00	2.00	2.00	2.00	2.00	4.50	1.00	0.25
	뒤음차	5.00	5.50	2.50	2.50	2.50	2.50	4.00	0.75	0.25
봄차:여름차 (50:50)	증제차	5.00	4.50	2.00	2.00	1.75	1.75	4.50	0.75	0.25
	뒤음차	4.50	4.50	2.00	1.75	1.75	1.75	4.00	0.50	0.25
봄차:가을차 (50:50)	증제차	5.00	5.00	2.50	2.00	2.00	2.00	4.50	0.75	0.25
	뒤음차	5.50	5.00	2.50	2.00	2.00	2.00	5.00	1.25	0.25
여름차:가을차 (50:50)	증제차	4.50	4.50	2.50	2.00	2.00	1.75	4.00	0.75	0.25
	뒤음차	5.00	5.00	3.00	2.00	2.00	2.00	6.00	1.00	0.25
여름차:가을차 (75:25)	증제차	5.50	6.00	2.50	2.50	2.50	2.50	5.00	1.00	0.25
	뒤음차	4.50	4.50	1.75	1.75	1.75	1.75	4.50	0.75	0.25
여름차:가을차 (25:75)	증제차	5.50	4.50	2.00	2.00	2.00	2.00	6.50	1.25	0.25
	뒤음차	5.50	6.00	2.50	2.50	2.50	2.50	5.00	1.00	0.25
봄차:여름차:가을차 (10:20:70)	증제차	5.50	5.00	2.50	2.00	2.00	2.00	4.50	1.00	0.25
	뒤음차	5.00	5.00	2.50	2.00	2.00	2.00	4.50	1.00	0.25
봄차:여름차:가을차 (10:40:50)	증제차	5.50	5.50	2.50	2.50	2.50	2.50	5.50	1.00	0.25
	뒤음차	4.50	4.50	1.75	1.75	1.75	1.75	4.00	0.50	0.25
시중 시제품 O사	세작티백	6.00	4.50	3.00	3.00	2.00	2.00	6.00	1.00	0.50
	세작	6.00	6.00	3.50	2.50	2.50	2.50	6.00	1.00	0.25
	뒤음차	6.00	5.00	3.00	2.50	2.50	2.50	7.00	1.00	0.25

* 시료 향미강도는 0~15 강도 척도법, N=6, 평균값



[그림 7] 블렌딩 베이스녹차 향미 프로파일의 주성분 분석

블렌딩 베이스녹차 향미 프로파일의 주성분 1이 전체 데이터의 약 66%를, 그리고 주성분 2가 약 19%를 설명하였다. 주성분 분석은 시료 간, 그리고 특성과의 관계를 상대적으로 나타내어주는 도식으로, 시료의 위치가 0점을 기준으로 같은 방향에 위치할수록, 그리고 가까울수록 비슷하다고 간주할 수 있다. 특성과의 관계도 같다. 하지만 상대적인 관계를 나타내는 것이므로 해석을 할 때에는 [표 18]와 같이 강도 데이터를 병행하여야 한다.

전반적으로 향미의 강도가 높은 시료는 1 사분면과 4 사분면, 즉 PCA의 우측에 위치하고 있고 쓴맛이 상대적으로 낮고 조화로우며 클수록 1 사분면에, 쓴맛이 강한 시료는 4사분면에 위치하고 있는 것을 볼 수 있지만, 강도의 범위는 전반적인 향미 강도의 최저값이 4.5정도, 최고값이 6.0 정도, 그리고 쓴맛 강도의 최저값은 4.0, 최고값은 7.0으로 차이가 그리 크지 않음을 알 수 있었다.

(2) 블렌딩베이스녹차의 묘사분석과 차 성분 기기분석 결과의 상관관계

[표 19] 녹차의 묘사분석과 차성분 기기분석 결과의 상관관계

Correlation coefficient (p-value)	Overall Flavor 전반적인 향미강도	Blended 조화로운	Grass Flavor 풀향미	Brown Aromatics 구수한맛	Astringent 떫은맛	Salty 짠맛	Mouth Contraction 입안수축감	Color 색
총질소 (NIR)	0.5270 (0.017)	0.5378 (0.0144)	0.6357 (0.0026)	0.6632 (0.0014)	0.6863 (0.0008)	0.6863 (0.0008)	0.6372 (0.0025)	0.6409 (0.0023)
탄닌 (비색정량)	-0.8675 (<.0001)		-0.6159 (0.0038)	-0.5576 (0.0106)				
녹색도		0.6658 (0.0014)	0.5166 (0.0197)	0.6020 (0.005)	0.8138 (<.0001)	0.6765 (0.0011)	0.7850 (<.0001)	0.7878 (<.0001)
EGC					0.5644 (0.0095)	0.5821 (0.0071)	0.6508 (0.0019)	0.6349 (0.0026)
EC		0.5560 (0.0109)			0.7332 (0.0002)	0.5490 (0.0122)	0.6063 (0.0046)	0.6206 (0.0035)
ECG	-0.7852 (<.0001)							
Caffein	-0.7264 (0.0003)							
환원당	0.5099 (0.0216)	0.5531 (0.0114)	0.5759 (0.0079)	0.6038 (0.0048)	-0.6228 (0.0034)	-0.6992 (0.0006)	-0.6837 (0.0009)	-0.6715 (0.0012)
Vitamin C (NIR)	-0.7974 (<.0001)		-0.5184 (0.0192)					

* 상관관계 (-1 < r < 1) *p < .05 **P < .01, ***p < .001

(3) 블렌딩녹차의 소비자 기호도

[표 20] 기능성 및 기호성 블렌딩녹차 시제품 6종 소비자 기호도 조사

시료	전반적 기호도	색 기호도	향미 기호도	단맛 기호도	쓴맛 기호도	떫은맛 기호도	쓴맛 강도	떫은맛 강도
기억력 개선차 증제 베이스녹차	5.1 ^b	6.1 ^{ab}	4.9 ^{bc}	5.3 ^b	5.4 ^{bc}	5.1 ^c	1.6	3.8
기억력 개선차 덧음 베이스녹차	5.1 ^b	6.1 ^{ab}	4.7 ^c	5.1 ^b	5.3 ^c	5.1 ^c	1.7	3.8
면역력증진차 증제 베이스녹차	5.0 ^b	5.8 ^{bc}	5.0 ^{bc}	5.3 ^b	5.2 ^c	5.2 ^{bc}	1.8	3.9
면역력증진차 덧음 베이스녹차	5.2 ^b	5.8 ^c	5.1 ^b	5.4 ^b	5.4 ^{bc}	5.3 ^{bc}	1.7	3.8
항산화성차 증제 베이스녹차	5.9 ^a	6.3 ^a	6.4 ^a	5.8 ^a	5.7 ^{ab}	5.7 ^{ab}	1.5	3.5
항산화성차 덧음 베이스녹차	6.0 ^a	6.3 ^a	6.0 ^a	5.8 ^a	5.8 ^a	5.6 ^a	1.6	3.7
LSD	0.44	0.29	0.44	0.34	0.37	0.39	0.22	0.44
p-value	<.0001	0.0002	<.0001	0.0002	0.0225	0.0031	0.3417	0.5179

* 9점 척도법, N=100, 평균값 차이는 일원배치분산분석, 사후검증 LSD

소비자의 기호도 조사는 9점 기호척도를 이용하여 평가하였다. 시료는 투명 유리잔에 한 번에

한 가지씩 제공되었고, 소비자는 전반적인 기호도 외, 색, 향미, 단맛, 쓴맛, 떫은맛의 기호도와, 쓴맛과 떫은 맛의 강도를 평가하였다. 그 값의 분산분석 결과를 [표 4]에 나타내었다. 전반적인 기호도와 향미, 단맛 기호도에서 향산화 기능을 가진 1A와 2A가 유의적으로 기호도가 높았다. 기억력 개선 기능차와 면역력 기능 개선 차는 유의적인 차이가 없었고 ‘좋지도 싫지도 않다’의 기호 강도로 나타났다.

(4) 소비자 차 선택에 영향을 미치는 요인 빈도

[표 21] 소비자의 차 선택에 영향을 미치는 요인 빈도 결과 (항목당 중복선택가능)

질문	선택항목	빈도	
차를 마실 때 원하는 기능성	면역력향상	40	
	항산화성	30	
	노화방지	28	
	기억력향상	17	
	피부미용	41	
	다이어트	36	
	기타	22	
	녹차를 마시는 이유	다이어트	10
		휴식	39
		심신안정	32
차향미		47	
건강		28	
커피섭취가 싫어서		22	
카페인 함량이 높다고 생각해서		6	
카페인함량이 낮다고 생각해서		5	
기타		13	
녹차의 선택시 중요하게 생각하는 요인		맛	76
	향	72	
	색	10	
	경험	29	
	구성재료	11	
	외관	14	
	가격	35	
	브랜드	12	
	기능성	2	
	기타	0	

부산대학교 학생을 대상으로 소비자의 차 선택에 영향을 미치는 요인에 대한 질문의 결과는 [표 21]에 나타났다. 이 항목은 중복선택이 가능하도록 하였는데, 소비자들이 차를 마실 때 원하는 기능성은 피부미용 41%, 면역력 향상 40%, 다이어트 36%, 항산화성 30%, 노화방지 28%, 기억력향상 17%의 순으로 나타나 피부미용과 다이어트 등 beauty관련 기능성에 관심을 나타내었으며, 면역력향상, 항산화 및 노화방지 등의 건강에도 관심을 보였다. 하지만 기억력 향상은 차에서 원하는 기능성으로는 보이지 않아, 추후 피부미용에 관련된 기능성 차를 개발하여야 할 것으로 사료되었고, 면역력향상 기능의 차는 기호 개선을 위한 제품개발이 이루어져야 할 것이다.

2-3. 블렌딩녹차 레시피 개발 및 시제품 3종 제조 < 3차년도 >

가. 기능성별 소비자 선호 블렌딩녹차 레시피 원료배합비 구명

(1) 항산화 기능성 블렌딩녹차 블렌딩비율별 관능적 기호도 및 항산화성

[표 1] 항산화 기능성 블렌딩녹차 제조를 위한 원료배합 비율

블렌딩 비율 베이스차 부재료	블렌딩 비율 1 (%)	블렌딩 비율 2 (%)	블렌딩 비율 3 (%)	블렌딩 비율 4 (%)
베이스녹차	80	70	60	50
대나무잎	7	10	15	20
레몬그라스	5	10	10	15
페퍼민트	5	5	10	10
감국	3	5	5	5

[표 2] 항산화 기능성 블렌딩녹차 관능적 기호도

블렌딩 비율 평가항목	블렌딩 비율 1	블렌딩 비율 2	블렌딩 비율 3	블렌딩 비율 4
외형(형태, 섀택)	5.0±0.7	6.2±1.1	6.6±0.9	6.6±2.1
차물색	6.3±1.5	7.0±0.9	6.8±1.2	6.4±1.4
향	6.3±1.2	7.5±0.6	6.0±1.4	6.0±1.7
맛	6.5±1.8	6.7±2.1	6.5±1.1	6.3±1.9
차의 전체적 기호도	6.3±0.5	6.9±0.7	6.5±0.7	6.3±1.4

* 9점척도법, N=8, 평균±표준편차



[그림 1] 항산화 기능성 블렌딩녹차 재료배합비별 4종 및 관능평가

[표 3] 항산화성 블렌딩차의 기호 성분 및 색도

블렌딩 비율 평가항목	수분 (%)	총질소 (%)	카페인 (%)	탄닌 (%)	색도		
					L값	a값	b값
블렌딩 비율 1	3.1±0.0	3.78±0.0	2.2±0.0	11.5±0.0	48.7±0.3	-5.8±0.2	16.9±0.3
블렌딩 비율 2	3.4±0.0	3.73±0.0	2.2±0.0	10.8±0.1	49.6±0.0	-5.8±0.1	17.4±0.1
블렌딩 비율 3	3.8±0.0	3.82±0.0	2.2±0.0	10.3±0.1	49.4±0.0	-5.7±0.1	17.0±0.0
블렌딩 비율 4	4.3±0.1	3.81±0.0	2.3±0.0	9.3±0.1	50.2±0.1	-5.7±0.0	17.1±0.1

[표 4] 항산화 기능성 블렌딩녹차의 기능 성분 및 항산화성

블렌딩 비율 평가항목	블렌딩 비율 1	블렌딩 비율 2	블렌딩 비율 3	블렌딩 비율 4
총페놀(mg/g)	63.4±1.8	57.8±1.6	55.5±1.4	45.0±0.4
플라보노이드(mg/g)	42.5±3.9	43.3±2.3	46.7±3.1	40.9±2.4
총아미노산(mg/g)	10.5±0.3	9.7±0.1	9.4±0.3	8.8±0.4
항산화성(Vit Ceqmg/g)	50.5±0.8	50.8±0.1	50.1±0.7	47.9±1.5

기능성별 소비자 선호 블렌딩녹차 레시피 개발 및 제품화를 위해 먼저 항산화 기능성 소재를 선별하고 [표 1]과 같이 베이스녹차 대나무잎 베이스녹차 70%, 대나무잎 10, 레몬그라스 10, 페퍼민트 5, 감국 5 배합비율에서 가장 기호도가 높았으며, 항산화성도 가장 높게 나타났다.

(2) 기억력개선 기능성 블렌딩녹차 블렌딩비율별 관능적 기호도 및 항산화성

[표 5] 기억력개선 기능성 블렌딩녹차 원료배합비율

블렌딩비율 배 이스차 부재료	블렌딩 비율 1 (%)	블렌딩 비율 2 (%)	블렌딩 비율 3 (%)	블렌딩 비율 4 (%)
베이스차(봄차 100%)	50	60	50	60
은행잎	20	10	20	10
비파잎	15	10	10	15
페퍼민트	5	10	10	10
구기자	5	5	5	5
목련꽃잎	5	5	5	5

[표 6] 기억력개선 기능성 블렌딩녹차 관능적 기호도

블렌딩 비율 평가항목	블렌딩 비율 1	블렌딩 비율 2	블렌딩 비율 3	블렌딩 비율 4
외형(형태, 색택)	5.6±0.8	6.0±0.6	6.3±0.8	6.3±1.1
차물색	6.4±1.8	7.0±1.4	6.6±1.1	6.7±1.1
향	6.4±1.7	6.3±1.6	5.9±1.7	6.4±1.6
맛	7.1±1.5	5.4±0.5	6.0±1.3	6.0±1.7
차의 전체적 기호도	7.1±1.5	5.7±1.3	6.3±1.1	6.1±1.5

* 9점척도법, N=8, 평균±표준편차



[그림 2] 기억력개선 기능성 블렌딩녹차 재료배합비율 4종 및 관능평가

[표 7] 기억력개선 블렌딩녹차의 기호 성분 및 색도

블렌딩 비율 평가항목	수분 (%)	총질소 (%)	카페인 (%)	탄닌 (%)	색도		
					L값	a값	b값
블렌딩 비율 1	3.5±0.0	5.2±0.0	3.1±0.0	13.6±0.0	46.8±0.1	-6.8±0.0	13.8±0.1
블렌딩 비율 2	3.6±0.0	5.1±0.0	2.9±0.0	13.3±0.1	47.3±0.4	-6.7±0.0	14.3±0.4
블렌딩 비율 3	3.7±0.0	4.9±0.0	2.8±0.0	12.9±0.0	47.1±0.1	-6.6±0.0	14.1±0.1
블렌딩 비율 4	3.9±0.0	4.8±0.1	2.5±0.1	12.2±0.2	47.1±0.2	-6.7±0.1	15.0±0.2

[표 8] 기억력개선 기능성 블렌딩녹차의 기능 성분 및 항산화성

블렌딩 비율 평가항목	블렌딩 비율 1	블렌딩 비율 2	블렌딩 비율 3	블렌딩 비율 4
총페놀(mg/g)	55.6±1.1	60.8±1.4	51.7±1.2	61.2±1.7
플라보노이드(mg/g)	37.8±1.5	44.3±1.7	37.9±2.7	44.2±1.3
총아미노산(mg/g)	19.8±0.7	21.4±0.9	18.4±1.2	22.0±0.9
항산화성(Vit C eq.mg/g)	36.0±0.1	34.8±0.1	35.9±0.1	34.9±0.0

기억력개선 기능성 블렌딩녹차 제품화를 위해서 [표 5]와 같이 베이스녹차, 은행잎, 비파잎, 목련꽃, 구기자, 페퍼민트를 4가지 재료배합비율별로 블렌딩한 후 9점척도법으로 블렌딩한 결과 그 중 베이스녹차 50%, 은행잎 20, 비파잎 15, 목련꽃잎 5, 구기자 5, 페퍼민트 5의 재료배합비가 가장 기호도가 높았다.

(3) 면역력증진 기능성 블렌딩녹차 블렌딩비율별 관능적 기호도 및 항산화성

[표 9] 면역력증진 기능성 블렌딩녹차 원료배합비율

블렌딩 비율 평가항목	블렌딩 비율 1 (%)	블렌딩 비율 2 (%)	블렌딩 비율 3 (%)	블렌딩 비율 4 (%)
베이스차 부재료				
베이스차(봄차:가을차)	80	70	60	50
표고버섯	7	10	15	20
유자	10	15	15	20
생강	5	5	10	10

[표 10] 면역력증진 기능성 블렌딩녹차 관능적 기호도

블렌딩 비율 평가항목	블렌딩 비율 1	블렌딩 비율 2	블렌딩 비율 3	블렌딩 비율 4
외형(형태, 색택)	4.7±1.5	6.0±1.3	5.7±1.5	5.5±2.2
차물 색	3.8±0.9	5.7±1.2	4.7±1.5	3.7±0.8
향	5.2±1.8	6.5±1.6	5.7±1.9	6.0±2.4
맛	5.2±1.5	6.0±1.2	4.5±1.9	6.3±2.3
차의 전체적 기호도	4.7±1.1	6.0±0.9	5.4±0.8	5.4±1.5

* 9점척도법, N=8, 평균±표준편차



[그림 3] 면역력증진 기능성 블렌딩녹차 재료배합비별 4종 및 관능평가

[표 11] 면역력증진 블렌딩차의 기호 성분 및 색도

평가항목	블렌딩 비율	수분 (%)	총질소 (%)	카페인 (%)	탄닌 (%)	색도		
						L값	a값	b값
블렌딩 비율 1		2.4±0.0	4.3±0.0	2.5±0.0	12.4±0.1	49.4±0.2	-5.4±0.0	16.4±0.2
블렌딩 비율 2		2.4±0.0	4.1±0.0	2.4±0.0	11.7±0.1	50.3±0.2	-4.8±0.1	16.7±0.1
블렌딩 비율 3		2.3±0.0	3.9±0.0	2.3±0.0	10.9±0.0	51.9±0.3	-4.2±0.1	17.2±0.2
블렌딩 비율 4		2.3±0.1	3.8±0.0	2.2±0.0	10.4±0.0	52.7±0.1	-3.5±0.1	17.2±0.1

[표 12] 면역력증진 기능성 블렌딩녹차의 기능 성분 및 항산화성

평가항목	블렌딩비율			
	블렌딩 비율 1	블렌딩 비율 2	블렌딩 비율 3	블렌딩 비율 4
총페놀 (mg/g)	68.6±1.9	59.7±0.8	53.4±1.1	45.3±0.5
플라보노이드 (mg/g)	40.2±0.8	37.0±3.2	33.4±2.0	26.6±2.7
총아미노산 (mg/g)	21.9±3.3	18.2±0.8	18.6±0.4	18.9±0.9
항산화성 (Vit C eq.mg/g)	50.3±0.1	50.9±0.2	50.2±0.4	49.5±0.2

면역력증진 기능성 블렌딩녹차 제품화를 위해 [표 9]와 같이 베이스녹차, 표고버섯, 유자, 생강 소재를 4가지로 재료배합비별 블렌딩한 후 관능평가한 결과 그 중 베이스녹차 70%, 표고버섯 10, 유자 15, 생강 5가 가장 기호도가 높았으며, 항산화성도 가장 높게 나타났다.

나. 신개념 포장기술 적용 블렌딩차 시제품 제조

(1) 신개념 포장기술 적용 시제품 제조 : 티백, 티업, 캡슐 등 3종



티백 포장 제품

티업 포장 제품

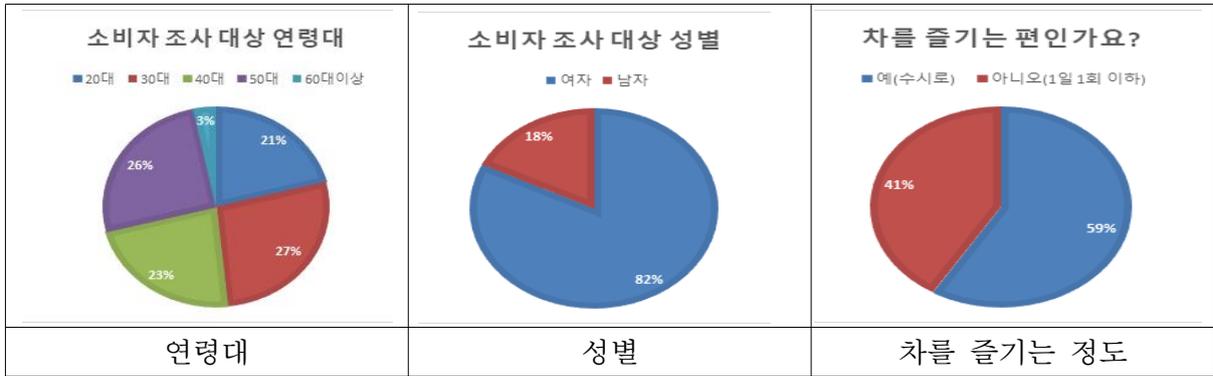
캡슐 포장 제품

[그림 4] 시제품 제조 3종

신개념 포장기술 적용한 블렌딩녹차는 [그림 4]와 같이 티백, 티업, 캡슐 포장적용과 각 기능성별 블렌딩녹차 제품명으로, 항산화성차는 동안이도다, 기억력개선차는 총명하도다차로, 면역력증진차는 튼튼하도다차로 작명하고 시제품 3종을 제조하였다.

(2) 일반 소비자 대상 시제품에 대한 소비자 선호도 조사 결과

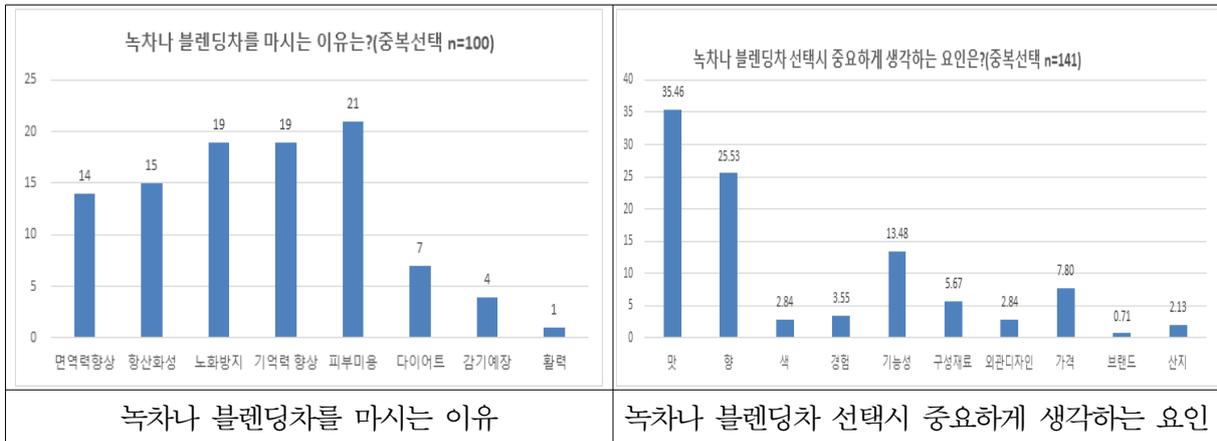
- 소비자 조사 대상 정보



[그림 5] 일반 소비자 조사 대상 정보(n=61)

제조한 블렌딩녹차 시제품에 대한 소비자 선호도 조사 대상에 대한 연령대, 성별, 차를 즐기는 정도 등에 대한 기초 조사를 실시하였는데, 20대가 21%, 30대가 27, 40대가 23, 50대가 26, 60대가 3%였으며, 소비자의 성별은 여자 82%, 남자 18이었으며 차를 즐기는 정도는 수시로 마신다 41%, 하루 1회 이하가 59%였다.

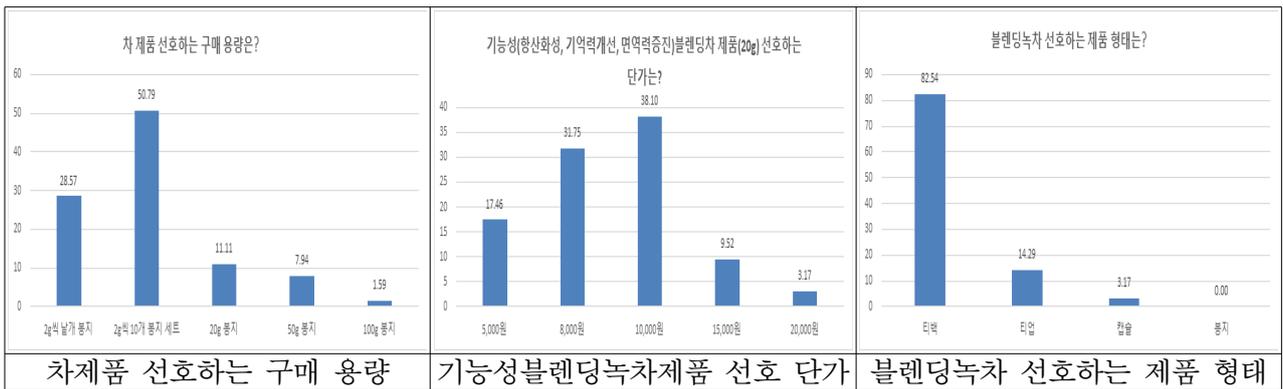
- 일반 소비자 조사 대상의 차에 대한 관심도



[그림 6] 일반 소비자 조사 블렌딩녹차에 대한 선호도(n=61)

일반 소비자 대상으로 차에 대한 관심도에서 녹차나 블렌딩차르 마시는 이유는 노화방지, 피부미용의 항산화성은 55%로 가장 많았고, 기억력개선 19%, 면역력증진 18%, 다이어트가 8%로 나타났다. 녹차나 블렌딩차 선택시 중요하게 생각하는 요인으로는 맛, 향, 기능성, 가격, 구성재료의 순으로 나타났다.

- 블렌딩녹차 제품에 대한 소비자 선호도 조사 결과

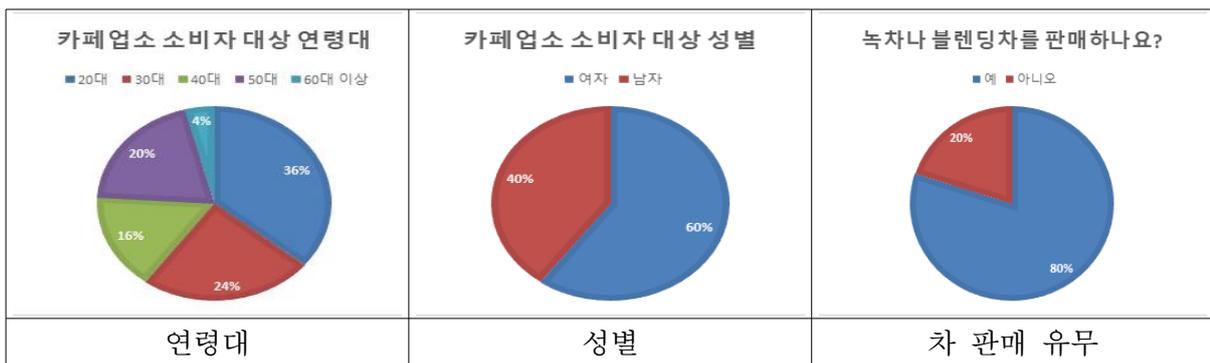


[그림 7] 소비자 블렌딩녹차 구매시 선호도 조사 결과(n=61)

일반 소비자의 블렌딩녹차 제품에 대한 선호하는 구매용량으로는 2g씩 날개 10개 봉지세트가 50.8%, 2g씩 날개봉지 28.6%, 20g봉지, 50g봉지, 100g봉지 순으로 소포장을 선호하는 것으로 나타났다.

(3) 카페업소 소비자 대상 블렌딩녹차 제품에 대한 선호도 조사 결과

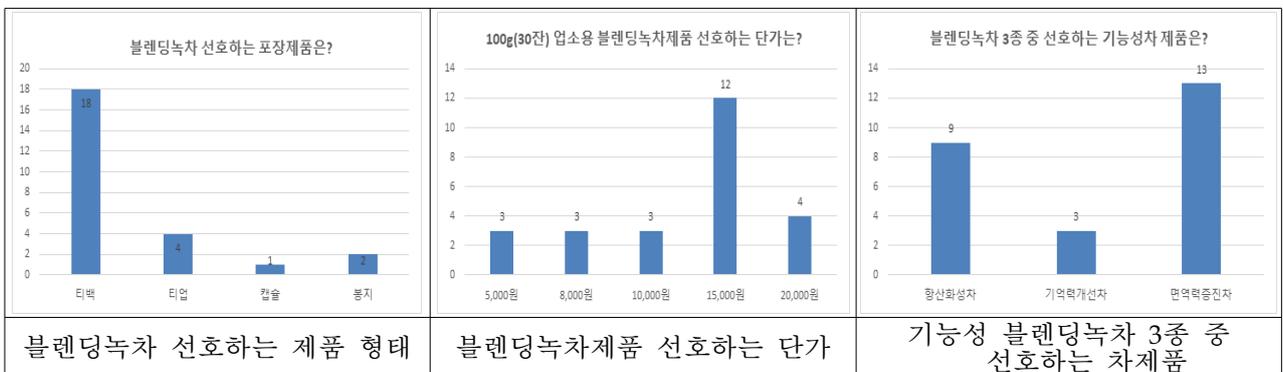
- 카페업소 소비자 대상 정보



[그림 8] 카페업소 소비자 조사 대상 정보(n=25)

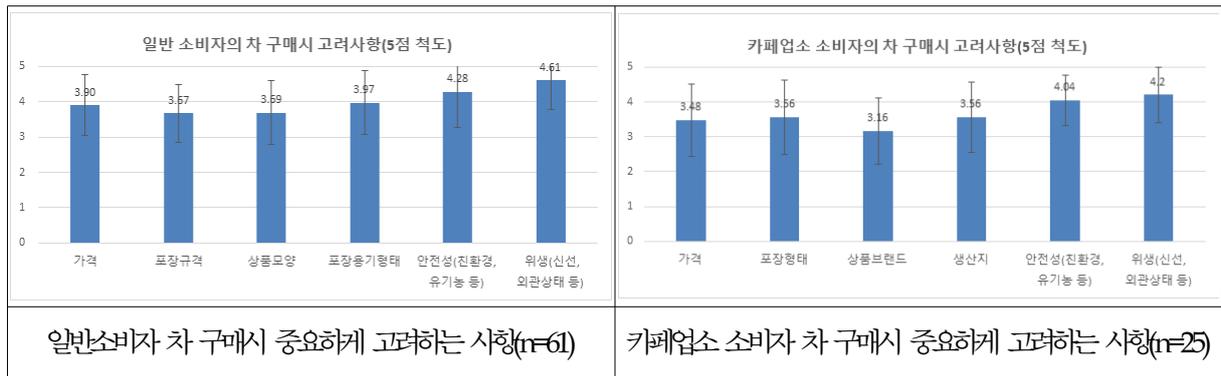
카페업소 소비자 대상 블렌딩녹차 제품에 대한 선호도 조사에서 조사대상 정보는 연령대는 20대가 36%, 30대가 24%, 40대가 16%, 50대가 20%, 60대가 4%였으며, 성별은 여자가 60%, 남자가 40%였다. 녹차나 블렌딩차를 판매하는지 여부는 판매한다가 80%, 그렇지 않다가 20%였다.

- 카페업소 소비자의 블렌딩녹차 제품에 대한 선호도 조사 결과



[그림 9] 카페업소 소비자 블렌딩녹차 구매시 선호도 조사 결과(n=25)

- 일반소비자 및 카페업소 소비자의 차 구매시 중요하게 고려하는 사항



[그림 10] 일반소비자 및 카페업소 소비자의 차 구매시 중요하게 고려하는 사항

(4) 2019 국제농업박람회 기능성 블렌딩녹차 시음회 및 소비자선호도 조사 결과



[그림 11] 국제농업박람회시 시음회 및 블렌딩녹차 선호도 결과(n=291)

기능성별 블렌딩녹차 3종에 대한 소비자 선호도 반응 조사를 2019년 국제농업박람회 중 관람객을 대상으로 실시한 결과(총 291명) 향산화성차(동안이도다) 좋다 92명(31.6%), 안좋다 9명(3%)이었고, 기억력개선차(충명하도다) 좋다 83명(28.5%), 안좋다 12명(4.1%)였으며, 면역력증진차(튼튼하도다) 좋다 85명(29.2%), 안좋다 10명(3.4%)였다.



[그림 12] 기능성 블렌딩녹차 시제품 3종

4절. 제3 협동기관 : (주)세원씨엔에스

1. 연구개발 추진전략 및 방법

가. 연구개발 추진전략

나. 연구개발 방법

(1). 녹차 폴리코사놀 추출 최적 초임계 추출 조건 확립

(1)-1. 실험재료 및 전처리

보성 녹차밭에서 10월에 가지치기과정에서 발생하는 녹차나무 잎을 추출용시료로 사용하였다. 상업용으로 판매되는 녹차잎차 및 녹차티백 5종을 구매하여 시료로 사용하였다.

(1)-2. 건조 차엽 제조

차엽을 건조오븐에서 60C에서 3시간 동안 건조하여 건조차엽을 제조하였다.

(1)-3. 차엽으로부터 헥산을 이용한 지용성 성분 추출

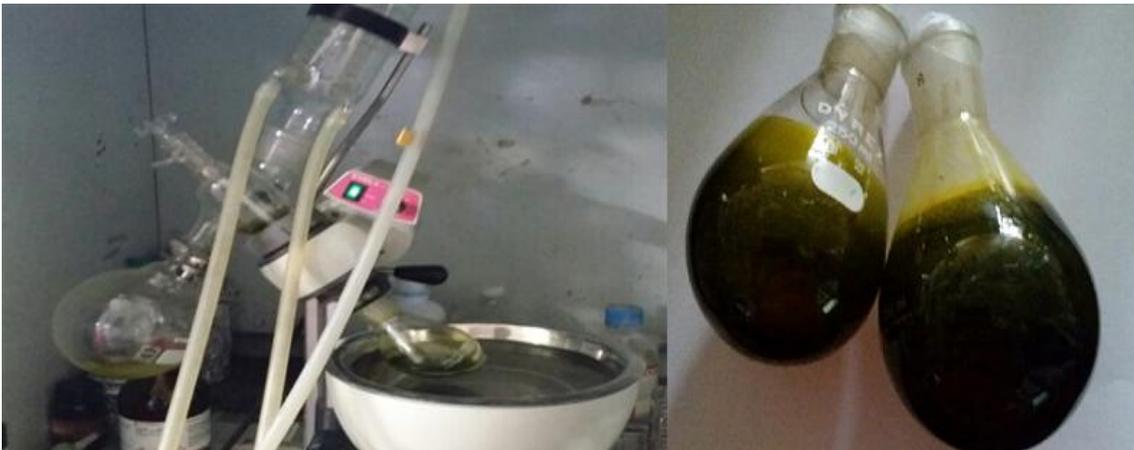


Fig. 1. 헥산추출을 위한 감압농축 장치와 추출물

건조 차엽을 믹서기에 분쇄 후 분쇄차엽 250g을 측량하여 유리재질의 병 (4 L용량)에 옮겨 넣었다. 50°C로 가열한 Hexane 1.5 L를 시료에 첨가한 후, 항온 수조 50°C에 30분 정치한 후 상등액을 회수 하였다. 2차로 같은 용매 1.5 L를 넣고 동일한 방법으로 추출하였고, 3차로는 1 L를 넣어 차엽으로부터 성분을 추출하였다. 추출한 헥산은 모두 한곳으로 합하여 필터한 후 감압농축하였다.

(1)-4. 차엽으로부터 초임계 이산화탄소 유체 추출장치를 이용한 지용성 성분 추출



Fig. 2. 초임계 이산화탄소 유체 추출장치

(추출 시험 1)

건조 차엽을 믹서기에 분쇄 후 분쇄차엽 80g을 측량하여 초임계 유체 추출장치에 옮겨 넣었다. 추출조건은 60°C로 하여 추출조 압력을 400, 450, 500 bar로 달리하여 2시간 동안 지용성 성분을 추출하였다.



Fig. 3. 초임계 유체 추출시험 1로부터 얻은 추출물

(추출 시험 2)

건조 차엽을 믹서기에 분쇄 후 분쇄차엽 200g을 측량하여 초임계 유체 추출장치에 옮겨 넣었다. 추출조건은 50°C로 하여 추출조 압력을 400 bar에서 2시간 동안 지용성 성분을 추출하였다. 추출은 200g씩 총 3회에 연속으로 행하여 추출물은 동일한 수기에 수거하였다.

(추출 시험 3)

건조 차엽을 믹서기에 분쇄 후 분쇄차엽 200g을 측량하여 초임계 유체 추출장치에 옮겨 넣었다. 추출조건은 50°C로 하여 추출조 압력을 400 bar에서 보조용매로 에탄올을 사용하여 1시간 30분 동안 지용성 성분을 추출하였다.

(1)-5. 차엽으로부터 식용유를 이용한 지용성 성분 추출

건조 차엽을 믹서기에 분쇄 후 분쇄차엽 1 kg을 측량하여 삼각플라스크에 옮겨 넣었다. 추출조건은 50℃ 추출용매로 식용유를 사용하여 1시간 30분 동안 지용성 성분을 추출하였다.

(1)-6. 차엽 지용성 추출물의 TMS화 반응 (Trimethylsilylation reaction)

Saponification 후 얻은 불검화물 시료를 1mL Hexane에 용해한 후, 시료 500 μL vial에 옮겨 담고, 질소가스를 사용하여 용매를 증발 농축시켰다. 이곳에 다시 Na₂SO₄로 탈수한 Chloroform을 200ul와 BSTFA in 1% TMCS를 400ul를 첨가하고, 항온수조에서 80℃에서 30분간 TMS화 반응을 시켰다.

(1)-7. 차엽 지용성 추출물의 폴리코사놀 분석

위에 기술한 방법으로 TMS화한 시료를 GC-MS/M를 이용하여 다음과 같은 조건에서 폴리코사놀 함량을 분석하였다.

Gas Chromatograph-MS/MS 분석조건

- Model : Shimadzu-Triple Quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Tokyo, Japan)
- Injection Volume = 1 μL
- Injection temp(℃) = 315℃
- Split ration = 1 : 3
- Capillary column DB-5MS (30m X 0.25mm I.D.)

폴리코사놀 GC-MS/MS법을 이용하여 얻은 폴리코사놀 standards 및 시중에서 구입한 녹차제품의 폴리코사놀의 MRM 크로마토그램을 나타낸 것이다.

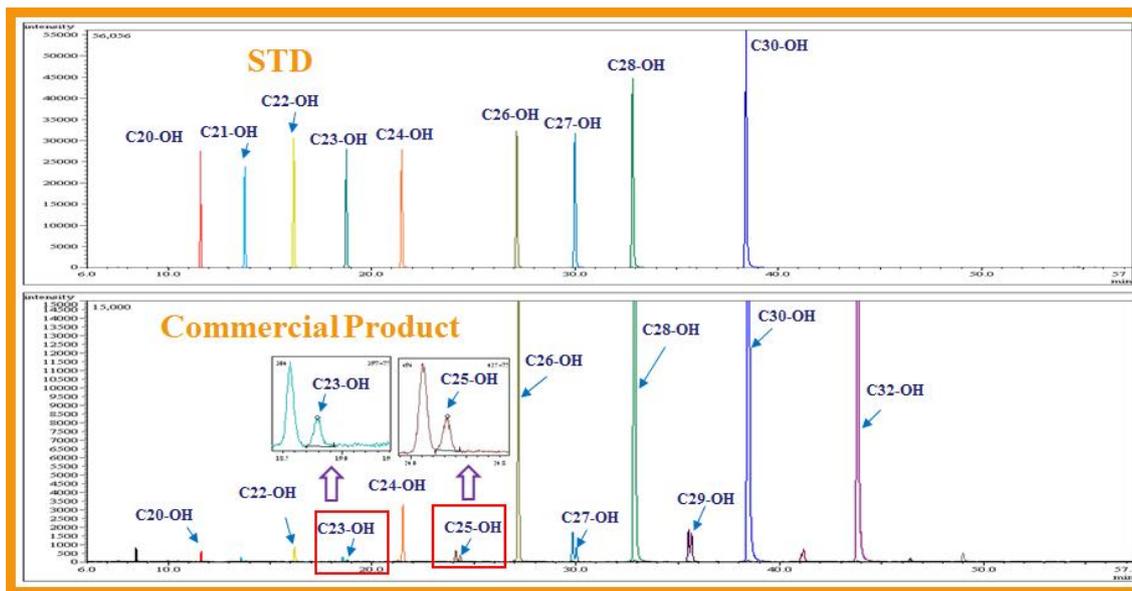
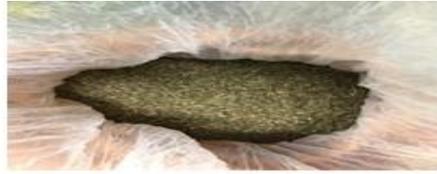


Fig. 1. Total ion chromatogram of gas chromatogram-tandem mass spectrometry in multiple reaction monitoring mode for authentic policosanols and commercial green tea leaf extract unsaponifiables

(2). 혈중콜레스테롤 저하 *in vitro* 기능성 효능 평가

(2)-1. 시료제조

혈중 콜레스테롤 저하 *in vitro* 효능평가를 위하여 녹차로부터 주정을 용매로 하여 초임계 추출을 수행한 후 회전진공농축기를 이용하여 효능평가를 위한 시료를 조제함



효능평가를 위한 시료 조제

(2)-2. 혈중콜레스테롤 저하 *in vitro* 기능성 효능 평가

(가) 전지방세포주(3T3-L1) cell culture

- American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양 받은 3T3-L1 지방세포를 해동 직후, 37 °C 에서 미리 가온한 DMEM media (DMEM + 10 % BCS + 1 % penicillin) 10 mL에 신속하게 넣은 후 1,000 rpm에서 3분간 원심분리하고 상등액을 제거하여 freezing medium 내의

DMSO를 제거

- Tapping을 한 후 다시 배지를 10 mL 가해주어 세포를 재현탁
- 30 mm culture dish에 세포 현탁액 3 mL을 가한 후 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 배양

(나) 분화 유도

- 3T3-L1 cell을 100 %까지 배양 후 2일간 더 배양
- 2일 후 MDI media로 교환 후 2일간 배양
(MDI media = DMEM + 1 μM dexamethasone + 1 μg/mL Insulin + 0.5 μM IBMX + 10% FBS + 1% peni)
- 2일 후 media를 버린 후 insulin media로 교환 후 2일간 배양
(insulin media = MDI media와 동일한 농도의 Insulin을 DMEM + 1% peni 배지에 넣음)
- 2일 후 media를 버린 후 DMEM + 10% FBS + 1% peni 로 교환 후 배양

(다) Adipocyte 관찰(Oil red O 염색)

- 지방세포 형성여부를 확인하기 위하여 Oil red O 염색을 수행함
- 즉, 분화가 유도된 세포를 PBS로 세척한 후, 4% formaldehyde로 20분 상온에 고정 시킨 뒤 PBS washing 함
- washing 후 60 % isopropanol을 5 분간 실온에서 배양하고 제거 후 Oil red O staining 용액(Sigma, USA)을 첨가하여 2 시간 동안 지방세포를 염색시킨 후, DW로 washing 하고 현미경을 통해 세포의 형태적 변화 관찰함

(3). 차엽으로부터 초임계추출 조건 최적화

(3)-1. 녹차엽 건조 공정

기존 녹차 건조 공정은 채취-급엽-증열-냉각-조유-유념-중유-제건-건조-선별-분쇄 공정으로 이루어져 있다. 제조 공정별 조건은 다원에서 생잎을 채취하여 고잎이나 줄기를 선별한 후, 급엽기에서 선별된 원료를 차엽의 발효를 정지하기 위하여 덩음기를 이용하여 덩긴다. 불활성화된 차엽을 공랭식 환풍기로 냉각시킨 후, 이송 컨베어 라인을 통하여 조유기로 옮긴 후 생잎온도 25°C, 열풍온도 100°C에서 15분간 건조한다. 이를 유념기에서 비빈 후 중유기에서 50°C 풍열로 찢 후, 다시 50°C~80°C로 제건하며, 건조기에서 100°C에서 20~40분간 건조하여, 풍력으로 선별하고 분쇄기에서 미세용차 또는 도형차용을 제작하였다. 이들 공정은 열에 의한 불활성화 및 건조과정을 반복적으로 처리하여 녹차잎의 벤조피렌 함량을 높이는 원인으로 여겨진다.

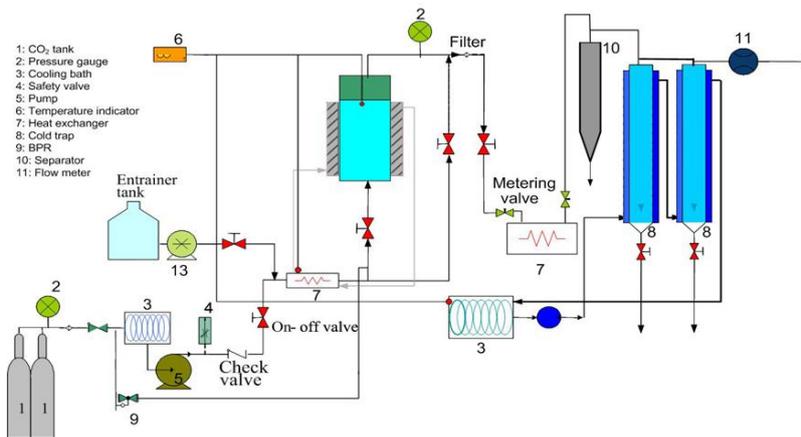
본 연구에서는 기존의 방법과는 달리, 녹차 생엽을 채취하여 차잎의 효소 불활성화를 위하여 65°C에서 5분간 데친 후, 바로 유념기로 이송하여 비빈 후, 강제식 건조기에 60°C로 온도를 고정하여 채반위에 녹차잎을 깔아서 1시간 동안 건조하여 녹차 건잎을 준비하였다.



<녹차 생엽을 송풍식 건조기에서 건조하는 과정>

(3)-2. 녹차 초임계 추출물 제조

초임계유체 추출장치는 추출조, 분리조, 가압펌프로 구성되어 있으며, 녹차 1 kg을 추출조 (HA 630-40-150, China)에 채우고, 추출온도는 50°C, 압력을 30 MPa로 온도조절기와 가압펌프를 조절한 후 추출조건에 이르면 초임계유체인 CO₂ (SCF-CO₂) 100 mL와 co-solvent (대두유) 100 mL를 연속적으로 통과시켜주면서 150분 동안 추출하여 녹차 초임계 추출물을 제조하였다.





녹차 초임계추출물은 (주)세원 씨엔에스와 남부대학교에서 공동으로 생산 공정을 최적화하여 제조하였으며, 정량분석은 우석대학교에서 수행하였다. 표준물질은 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 조제 및 회석하여 사용하였다. n-Hexane, dichloromethane, N,N-dimethylformamide (DMF), acetonitrile 등은 HPLC용 또는 잔류농약용으로 Merck사(Darmstadt, Germany)에서 구입하였고, sodium sulfide nonhydrate는 Sigma-Aldrich Chemical Co.에서 구입하였다. 또한 Sep-Pak Florisil Vac Cartridge 3 cc/500mg(Waters, MA, USA)를 사용하였다.

(3)-3. 녹차 초임계 지용성물질의 정량 분석

차엽 추출은 동결건조한 차엽을 믹서기에 분쇄 후 분쇄차엽 26g 혹은 16g을 측량하여 유리재질의 병에 옮겨 넣었다. 50℃로 가열한 0.02%의 BHA를 첨가 Hexane 100 mL를 시료에 첨가한 후, 항온 수조 40℃에 30분 동안 126RPM으로 shaking 한 후 상등액을 회수 하였다. 2차로 같은 용매 100mL를 넣고 동일한 방법으로 추출하였고, 3차로는 50mL를 넣어 차엽으로부터 성분을 추출하였다. 추출한 헥산은 모두 한곳으로 합하여 총 용량이 250mL가 되도록 정용하였다.

(3)-4. 차엽 지용성 추출물의 비누화 반응을 이용한 불검화물 수거

지용성 녹차 추출물은 12% ethanolic KOH용액으로 항온수조에서 60℃에서 90분간 반응한 후 0.02% 함유 헥산으로 수회 추출하여 불검화물을 얻었다.

(3)-5. 차엽 지용성 추출물의 TMS화 반응 (Trimethylsilylation reaction)

Saponification 후 얻은 불검화물 시료를 1mL Hexane에 용해한 후, 시료 500 μ L vial에 옮겨 담고, 질소가스를 사용하여 용매를 증발 농축시켰다. 이곳에 다시 Na₂SO₄로 탈수한 Chloroform을 200ul와 BSTFA in 1% TMCS를 400ul를 첨가하고, 항온수조에서 80°C에서 30분간 TMS화 반응을 시킨다.

(3)-6. 차엽 지용성 추출물의 폴리코사놀 분석

위에 기술한 방법으로 TMS화한 시료를 GC-MS/M를 이용하여 다음과 같은 조건에서 폴리코사놀 함량을 분석한다.

Gas Chromatograph-MS/MS 분석조건

- Model : Shimadzu-Triple Quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Tokyo, Japan)
- Injection Volume = 1 μ L
- Injection temp(°C) = 315°C
- Split ration = 1 : 3
- Capillary column DB-5MS (30m X 0.25mm I.D.)

(3)-7. 색도 측정

각 시료 3 g을 취한 후 색차계(Colorimeter, CM-3500d, Konica Minolta, Japan)를 이용하여 L (명도), a(적색도), b(황색도)값을 측정하였으며, 색도값 ΔE 는 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\Delta E = [(L_{\text{sample}} - L_{\text{standard}})^2 + (a_{\text{sample}} - a_{\text{standard}})^2 + (b_{\text{sample}} - b_{\text{standard}})^2]^{0.5}$$

흰색표준판의 기준 표준값은 다음과 같다. (L= 92.93, a= -0.83, b= -0.89).

초임계 추출물의 점도는 점도계(Viscometer, DV-III, Brookfield, USA)를 이용하여 시료 1 mL를 취하여 온도 25°C, spindle No. 52, 10 rpm으로 30초간 작동시킨 후 점도를 측정하였다.

다. 연구개발 추진체계

라. 연구개발 추진일정

2. 연구 내용 및 결과

2-1. 녹차 폴리코사놀 추출 최적 초임계 추출 조건 확립 (1차년도)

가. 추출방법에 따른 차엽추출물의 성분조성 및 함량

(1) 차엽으로부터 초임계 이산화탄소 유체 추출장치를 이용한 지용성 성분 추출

(가). 1차 초임계 유체 추출시험

표 1은 건조 차엽을 초임계유체추출장치를 이용하여 추출조에서 동일한 추출온도 (60 C)에서 이산화탄소의 압력을 400, 450 및 500bar로 달리하여 120분동안 추출한 추출물중의 폴리코사놀 함량 및 조성을 나타낸 것이다. 건조차엽 80g으로부터 초임계유체 추출장치를 이용하여 이산화탄소의 압력을 400, 450 및 500bar로 달리하여 120분동안 추출한 추출물 핵산추출물 함량은 3.84 g, 4.27g 및 4.58g을 얻었다. 이는 각각 4.8, 5.3 및 5.8 %에 해당하였다. 이렇게 얻어진 추출물수율은 핵산추출에 비하여 높은 것으로 나타났다. 그러나 초임계유체추출물중의 폴리코사놀은 3709 - 5508 mg/kg으로 핵산추출물에 함유된 폴리코사놀함량에 비하면 그 함량이 매우 낮았다. 그리고 추출압력에 따라서도 약간의 추출효율이 다른 것을 확인 할 수 있었다. 초임계 추출장치를 통하여 추출물을 수거하는 과정에 추출조에 넣은 시료량에 비하여 얻어지는 추출물의 양이 극도로 적어서 추출조의 출구부분의 튜빙 및 추출조내부에 추출물이 엉겨붙어 효율적인 회수가 상당히 어려운 것으로 판단되었다.

Table 1 건조차엽의 추출조 압력을 달리하여 얻은 초임계유체추출물에 함유된 폴리코사놀 함량 및 조성

Policosanol	400bar - 120min	450bar - 120min	500bar - 120min
	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
C20-OH	14.43	34.72	21.73
C21-OH	-	0.43	-
C22-OH	68.38	95.52	83.53
C23-OH	16.75	19.83	16.21
C24-OH	71.81	108.21	81.95
C25-OH	25.21	32.65	25.98
C26-OH	202.31	380.95	227.80
C27-OH	56.85	74.75	59.51
C28-OH	855.34	1488.91	911.83
C29-OH	109.34	133.90	111.04
C30-OH	1353.62	1950.49	1251.75
C31-OH	146.83	153.68	143.23
C32-OH	577.09	757.98	511.16

C33-OH	134.92	140.65	133.16
C34-OH	134.02	136.25	132.38
Total	3765.31	5508.92	3709.37

(나). 2차 초임계 유체 추출시험

표 2는 건조 차엽을 초임계유체추출장치를 이용하여 보조용매 (에탄올) 사용여부에 따른 추출물중의 폴리코사놀 함량 및 조성을 나타낸 것이다. 1차 초임계 연구에서 건조녹차엽 초임계 추출시 추출물의 양이 극도로 적어서 추출조의 출구부분의 튜빙 및 추출조내부에 추출물이 엉겨 붙어 효율적인 회수가 상당히 어려운 것으로 판단되어, 이차시험에서는 추출물의 회수를 용이하게 하기 위하여 200g씩 시료를 3회 연속 처리하였다. 에탄올을 보조용매로 사용하지 않고 얻은 초임계유체추출물중의 폴리코사놀은 8486 mg/kg이었으나, 알콜을 보조용매로 사용하여 얻은 추출물에서는 폴리코사놀함량이 16872 mg/kg으로서 보조용매를 사용하지 않은 경우에 비하여 그 함량이 2배 정도 높은 것으로 확인되었다.

Table 2. 건조차엽의 보조용매(에탄올)사용 여부에 따른 초임계유체추출물에 함유된 폴리코사놀 함량 및 조성

Policosanol	450bar 120min (mg/kg)	450bar 90min (보조용매사용) (mg/kg)
C20-OH	180.64	107.23
C21-OH	7.55	0.08
C22-OH	381.30	5.48
C23-OH	21.74	9.38
C24-OH	311.78	276.30
C25-OH	39.05	13.56
C26-OH	740.42	977.84
C27-OH	69.27	169.77
C28-OH	2746.51	4736.57
C29-OH	104.35	320.36
C30-OH	2800.23	6756.07
C31-OH	48.17	314.45
C32-OH	1021.27	2705.07
C33-OH	11.36	235.98
C34-OH	2.79	244.68
Total	8486.43	16872.81

2-2. 혈중콜레스테롤 저하 *in vitro* 기능성 효능 평가 (2차년도)

가. 용량설정 실험

최고 농도로 설정한 1000 $\mu\text{g/mL}$ 에서도 cell viability가 감소하지 않았으므로 “녹차추출 폴리코사놀의 3T3-L1에 대한 24시간 무독성량은 1000 $\mu\text{g/mL}$ ” 으로 사료됨

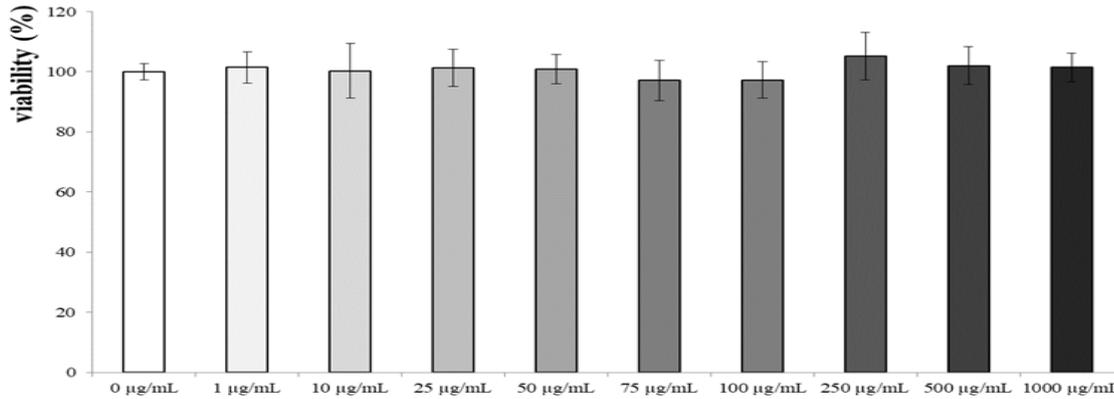


그림 1. 3T3-L1에 대한 녹차추출 폴리코사놀의 24시간 세포독성평가. 1000 $\mu\text{g/mL}$ 까지 세포에 대한 변화를 야기하지 않음

나. 지방세포 분화증식 저해능 검증 시험

녹차추출 폴리코사놀에 대한 3T3-L1 분화증식 억제능 검토를 위한 oil red O stain 결과 “녹차추출 폴리코사놀 250 $\mu\text{g/mL}$ 은 3T3-L1의 분화증식을 억제함” 을 확인하였음

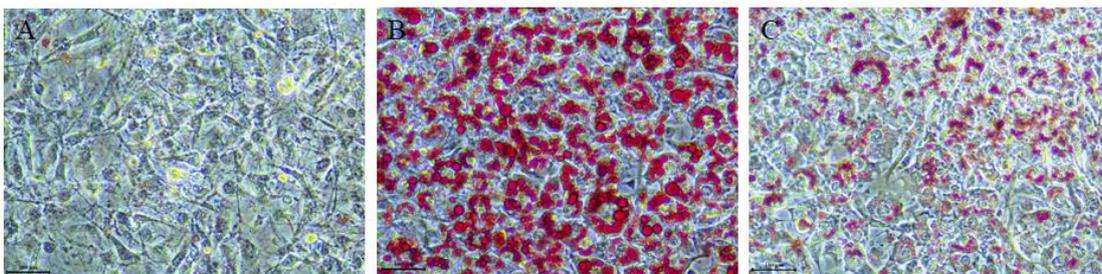


그림 1. 3T3-L1에 대한 녹차추출 폴리코사놀의 분화증식 억제능 결과. A, 분화가 없음. B, 높은 분화도를 보임. C, 250 $\mu\text{g/mL}$ 녹차추출 폴리코사놀 투여의 경우 약간의 분화가 관찰됨. A, control; B, differentiation; C, 250 $\mu\text{g/mL}$ 녹차추출 폴리코사놀, scare bar : 10 μL

- (1). 본 연구는 녹차추출 폴리코사놀의 지방세포 분화증식 저해능 검증이 목표임
- (2). 녹차추출 폴리코사놀의 proadipocyte인 3T3-L1에 대한 24시간 무독성량은 1000 $\mu\text{g/mL}$ 이며, 동일 세포종(3T3-L1)에 대한 분화증식억제 최소량은 250 $\mu\text{g/mL}$ 임
- (3). 시험결과를 통해서 녹차추출 폴리코사놀은 지방세포의 분화증식을 억제하는 것으로 확인됨

다. 혈중콜레스테롤 저하 *in vitro* 효능 평가

- 60% High Fat Diet로 유도한 C57BL/6 mouse의 녹차 폴리코사놀 혈행개선 검증 시험

(1). 시험 방법

(가). 시험물질 정보

물질명	녹차추출 폴리코사놀		
성상 및 특징	동결건조의 고형상, 진녹색		
입수일	2018. 01. 19	입수량(용기무게 포함)	270g
보관조건	냉장보관	유효기간	미정
입수처	주식회사 지엔바이오		
사진			

(나). 시험계 정보

종 및 계통	C57BL/6 mouse
공급원	Samtako Korea
성별	수컷
동물 수	30
주령	6

(다). *in vivo* 시험

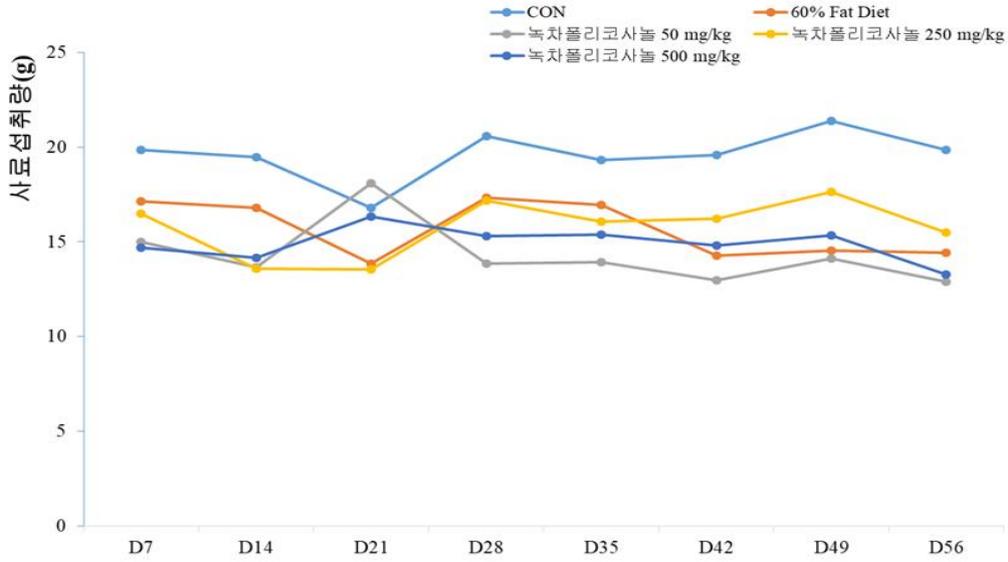
- 60% High Fat Diet로 유도한 C57BL/6 mouse의 녹차폴리코사놀 혈행개선 검증 시험

- 시험군 구성 및 투여량 설정

군	성 별	동물수	동물번호	High Fat Diet (HFD)	투여물질(농도)	투여액량 (μL/g)
G1	M	6	01 - 06	control	N/S	28
G2	M	6	07 - 12	HFD 60 %	N/S	28
G3	M	6	13 - 18	HFD 60 %	녹차폴리코사놀 50 mg/kg	28
G4	M	6	19 - 24	HFD 60 %	녹차폴리코사놀 250 mg/kg	28
G5	M	6	25 - 30	HFD 60 %	녹차폴리코사놀 500 mg/kg	28

- 투여 : 경구투여는 8주간 매일 실시하고 G1 및 G2는 생리식염수를 투여하였다.

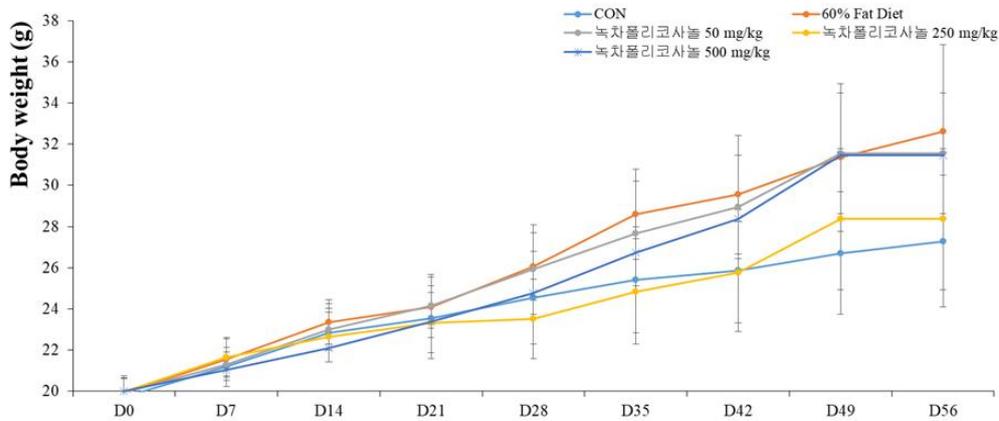
계획된 일자에 측정된 체중을 기준으로 정해진 투여약량에 맞게 산출하였다.



경구투여 시 1 mL 주사기를 이용하여 조제한 투여물질을 투여하였다.

- 부검: liver, 지방 채취하여 무게를 측정하였다. 혈액채혈을 실시하였다.

(2) *in vitro* 효능 평가 결과



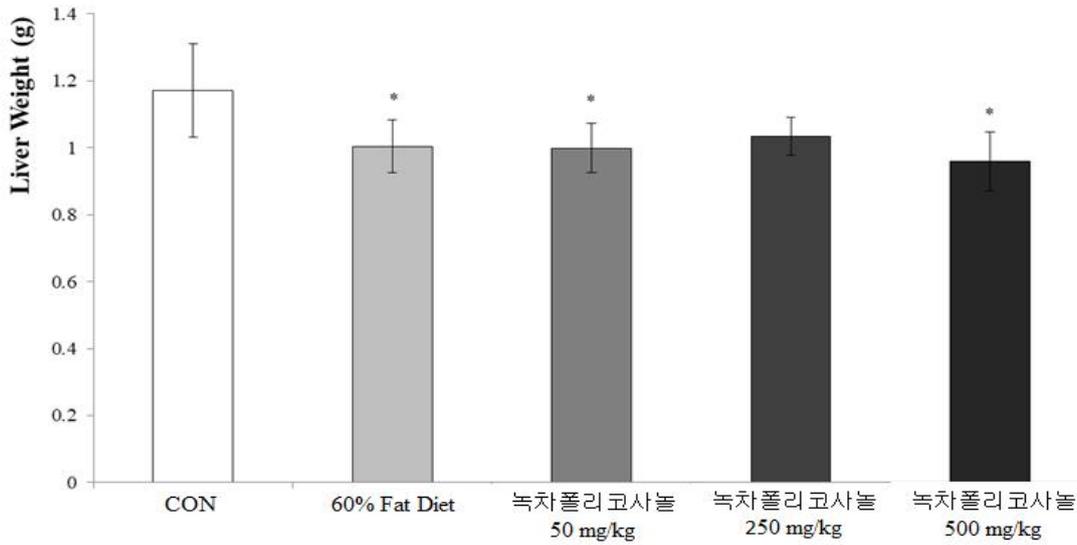
(가). 체중 및 사료량 측정

그림 1. 체중 측정량

그림 2. 사료 섭취량

(나). 내장지방량 무게 측정

- 지방의 무게는 CON과는 전체적으로 차이가 나지만 녹차폴리코사놀 250 mg/kg 와 녹차폴리코사놀 500 mg/kg는 60% Fat Diet 그룹보다 낮게 나왔다.



(다). 간 무게 측정

- 간 무게는 차이가 보이지 않았다,

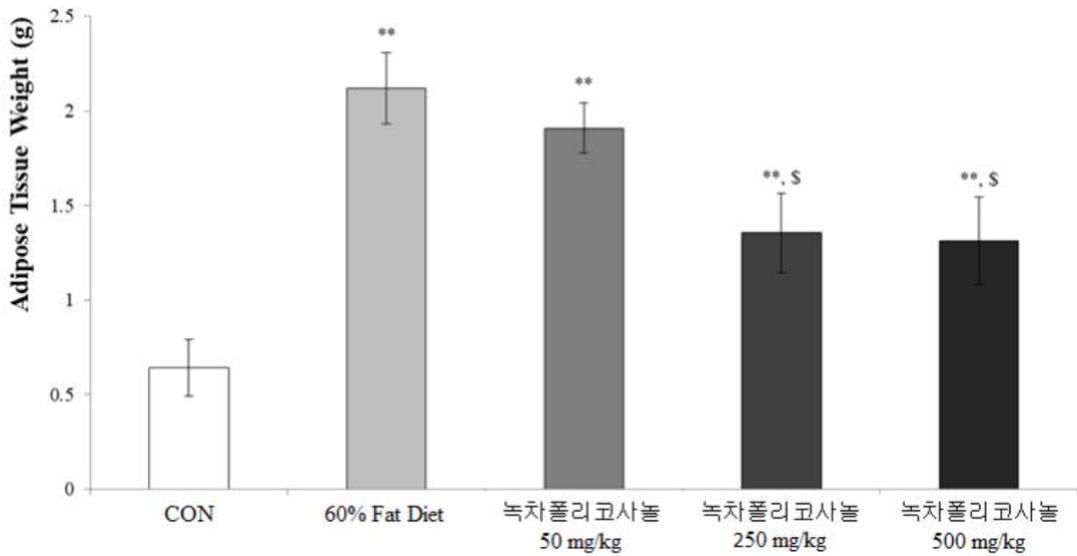


그림 4. Liver 무게

(3) 혈구분석

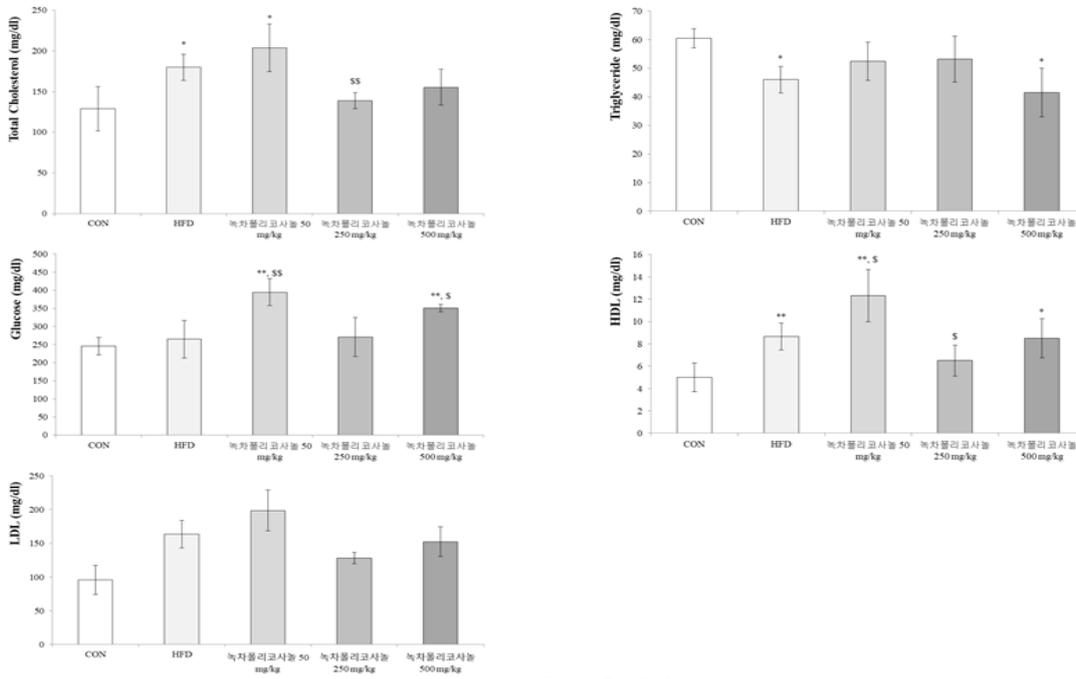


그림 5. 혈구분석

(4) 혈액생화학분석

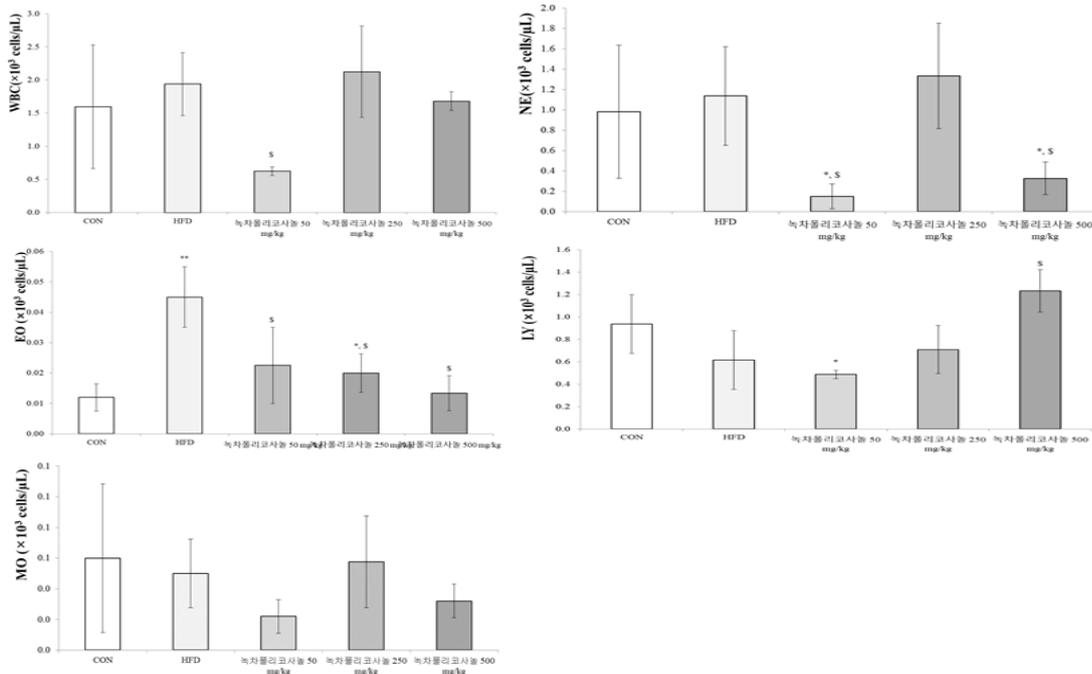
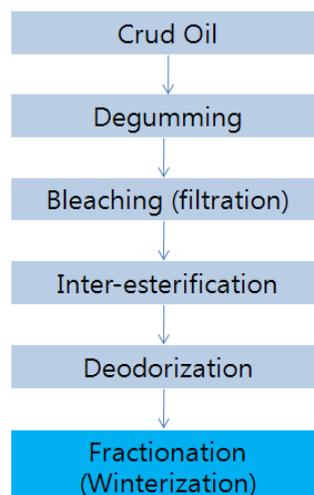


그림 6. 혈액생화학분석

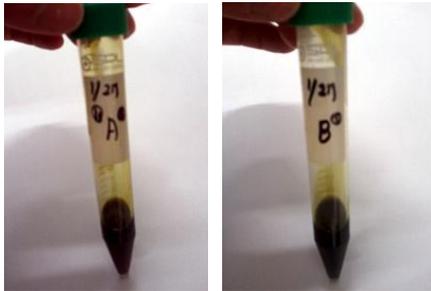
- 생엽을 건조하기 하여 일반적으로 Roasting 과정을 거치는 과정에서 열에 노출되어 녹차엽에 벤조피렌 성분이 생성되는 것으로 확인되었다. 초임계 추출 방법은 일반적으로 임계온도에서 추출하기 때문에 열에 매우 안정하여 추출과정 중에는 벤조피렌이 생성되지 않는 것으로 확인 하였다.
- 본사와 협동기관인 남부대학교가 공동으로 생엽 건조 공정 설계를 진행하였으며, 협동기관인 우석대학교와 녹차 초임계 지용성물질의 정성 정량분석을 수행하였다. 주관기관인 (주)세원씨엔에스와 협동기관이 긴밀한 협조관계를 유지하면서 역할분담을 통한 최적화된 초임계 지용성 녹차추출 원액을 얻고자 하였다.
- 4월부터 생엽을 채취하여 녹차엽의 건조 조건 및 파이토스테롤 및 고급지방산의 함량을 확인하였으며, 벤조피렌 생성을 원천적으로 막기 위한 새로운 생엽 건조공정 개발을 통하여 무함량 벤조피렌 제품 생산이 가능케 하였다.
- 녹차 생엽의 건조조건을 생엽의 수분함량, 건조 온도별, 건조 시간별로 구분하여 초임계 녹차 추출물의 폴리코사놀 함량을 측정하여 최적조건을 확립하였다.
- 위 비열처리 녹차 생엽 건조 실험을 통하여 경제적으로 생산할 수 있는 최적화 조건을 수립하여 초임계 녹차추출 원유를 상업화하고자 하였다.

1. 여과법에 의한 폴리코사놀 추출법 개발

일반적으로 추출 원유형태를 부분 정제유(refined oil)의 형태로 제조한 후 탈산, 탈색, 탈취 등의 정제과정을 거쳐며, 그 다음은 분획 (Fractionation)과정으로, 특정 온도에서 고체상의 물질을 제거하는 과정이다. 가장 널리 사용되는 방법은 결정화(crystalization)를 통한 분획방법으로 특정온도에서 녹는점이 다른 물질을 분리하는 방법이며, 그 중에서 “Dry fractionation”으로 자주 사용되어지는 방법이 Winterization 방법이다. Winterization 방법은 냉장온도에서 현탁액이 생기는것을 방지하기 위하여 식용유로부터 소량의 결정화 물질을 여과법을 이용하여 제거하는 방법이다.



<여과법에 의한 폴리코사놀 추출 공정도>



<사진. winterization 과정 후 policosanol-rich fraction>

본 연구에서 사용한 여과장치는 Whatman No.1을 이용한 필터링을 사용하였으며, 녹차유 원액의 점도가 1,800 Cpoise 이상으로 높아 Membrane/filter 장치는 사용할 수 없었다. 본 연구에서는 초임계 추출한 녹차유 원액을 냉장온도(-5°C ~0°C)에서 24시간 보관하였다가 원심분리 장치를 통하여 정제하여 시료를 채취하여 녹차 유래 폴리코사놀의 함량을 확인하였다.

녹차유 원액의 폴리코사놀 함량은 1662.5423 mg/kg을 보였으나, winterization 공정을 거친 후, 폴리코사놀 함량이 2818.8831 mg/kg으로 높이 검출되었다. 이는 녹차 원유 내 왁스물질이 온도에 의하여 결정화 되면서 일부 고급지방산인 폴리코사놀 성분이 농축된 것으로 추정된다. Winterization 공정을 통하여 60% 이상의 폴리코사놀 증가효과를 확인할 수 있었으며, 수율 손실은 약 2%정도 감소하는 경향을 보였다.

2. 비열처리 및 송풍식 건조기를 이용한 벤조피렌 무함량화

녹차유 내에 함유된 벤조피렌이 생성되지 않게 하기 위하여 비열처리를 통하여 벤조피렌 무함량화를 실시하였다. 녹차 생엽의 수분함량, 건조 온도(°C) 및 건조 시간(hr)이 녹차유 내에 함유된 벤조피렌의 생성에 영향을 미치는 주요 인자임을 확인하여 독립변수로 설정하였다. 생엽 녹차를 채취하여 60±5°C로 가열된 물에 5분간 침지하여 생엽의 효소 성분을 불활성화 하였다. 건조온도 및 건조 시간을 60±5°C로 설정 하였으며, 건조시간은 1시간 동안 송풍 건조한 후, 분쇄하여 녹차 건조가루를 준비하여 초임계 추출을 위한 시료로 제조하였다.

Table 1에 생엽의 수분함량 변화를 온도별로 측정한 결과이다. 건조 온도와 건조시간에 따른 벤조피렌 함량을 보여주고 있다. 모든 녹차 생엽의 경우 건조온도 및 건조시간의 증가에 따라 벤조피렌 함량이 높아지는 경향을 보였다. 가열온도를 70±5°C에서 30분 이상 건조하였을 경우 벤조피렌이 미세하게 생성되기 시작하였다. 순황토의 경우 2.0% 첨가 시에 20°C에서 처리한 녹차유 샘플은 3.2418 ppm 까지 감소되었으며, 80±5°C에서 처리한 녹차유 샘플은 벤조피렌 함량이 0.8214 ppm 까지 감소하였다. 활성탄 2.0% 첨가 시 20°C에서 처리한 녹차유 샘플은 2.8643 ppm 까지 감소되었으며, 80±5°C에서 처리한 샘플은 벤조피렌 함량이 0.5142 ppm 까지 현저하게 감소하였다. 실험에 사용한 흡착제 중 활성탄>순황토>제올라이트>백토 순으로 벤조피렌 함량 감소 추세를 보였다. 이들 4가지 광물의 혼합물을 첨가 하였을 경우는, 벤조피렌 함량이 0.0215 ppm 을 저감됨으로써 목표치인 2 ppb 이하로 벤조피렌 함량을 제거 하였다. 벤조피렌의 잔존량에 대하여 가열온도와 가열시간보다는 흡착제의 농도가 가장 유의적인 영향을 나

타내었지만, 녹차유 원액의 벤조피렌 함량 2 ppb 이하를 유지하기 위하여 가열온도 $80 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 24시간 반응 하는것이 최적 조건으로 적합하다.

Table 1. Experimental values of moisture contents (%) determined from 5 different heat temperature at different intervals.

Drying Temperature		Drying Time (min)							
		0	1	5	10	20	30	60	90
60°C	MC (%)	69.23	55.24	48.24	32.72	12.18	9.74	4.32	1.25
	BPC (ppb)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
70°C	MC (%)	69.23	45.32	32.54	28.82	8.21	6.72	2.34	-
	BPC (ppb)	0.000	1.352	2.352	3.157	4.215	5.648	6.839	-
80°C	MC (%)	69.23	12.35	9.24	6.24	4.52	-	-	-
	BPC (ppb)	0.000	5.24	7.352	11.543	14.922	-	-	-
90°C	MC (%)	69.23	11.5923	7.2143	4.21	2.86	-	-	-
	BPC (ppb)	0.000	7.215	13.214	21.354	30.514	-	-	-
100°C	MC (%)	69.23	5.32	3.54	-	-	-	-	-
	BPC (ppb)	0.000	12.252	19.256	-	-	-	-	-

* MC (%) : moisture content

** BPC (ppb) : benzo(a)pyrene contents

< 녹차엽의 비열처리 및 송풍식 건조법에 의한 준비과정 >



(1) 녹차 생엽 건조



(2)분쇄 녹차 칭량



(3)초임계추출기 충전기로 이송



(4)충진 완료



(5)보조용액 (대두유) 충전



(6)초임계 추출 공정



(7)채취된 초임계 지용성 녹차추출물 샘플

2-3. 인체적용시험 (3차년도)

가. 녹차엽 초임계추출 지용성물질 생산 공정 표준화 매뉴얼 작성

(1). 생산 공정 매뉴얼 작성

- 식품의 종류 : 녹차 초임계 추출액 (지용성 물질)
- Manufacture Processing (제조과정 및 방법)

Material & Tools

- ▷ 재료: 녹차 생엽
- ▷ 기기: 건조기, 초임계유체 CO₂를 사용하여 초임계 추출기

*** 녹차엽 초임계추출 지용성물질 생산 제조공정 ***

공정	세부사항
1 다원 (녹차밭) 채취	<input type="checkbox"/> 잎의 색상, 모양, 잎의 크기, 선명도를 확인하여 생잎 채취 및 선별 <input type="checkbox"/> 이 물질 (고잎, 줄기)등을 선별하여 제거한다.
2 급열 및 냉각 공정	<input type="checkbox"/> 선별된 원료를 60℃~ 65℃의 물에 침지하여 5분간 데친 후, 냉각기에서 공랭식 환풍기로 냉각
3 유념 공정	<input type="checkbox"/> 유념기(S-120)에서 녹차엽의 건조를 원활히 하도록 20분간 피막층을 벗기는 유념 공정을 거친다.
4 건조 공정	<input type="checkbox"/> 건조온도 60±1℃, 건조 시간 3 hr <input type="checkbox"/> 강제 송풍식 건조기를 이용하여 서서히 건조한다.
5 분쇄 공정	<input type="checkbox"/> 초임계추출을 위하여 건조한 녹차잎을 분쇄한다.
6 초임계 추출공정	<input type="checkbox"/> 건조 녹차잎 20kg을 초임계 추출조에 충전한 후, 3시간 동안 추출하여 초임계 녹차 추출액을 얻는다.

(2). 표준화된 매뉴얼에 따른 시제품 연질캡슐 샘플 제작

*** 녹차 폴리코사놀 (10mg/개) 연질캡슐 제조과정 ***

공 정		세 부 사 항
1	균질과정(Homogenizing)	<input type="checkbox"/> 초임계추출 지용성 녹차추출액 원액을 고형체가 없도록 균질기를 이용하여 5분간 균질화 한다.
2	연질 캡슐 공정(Preparing)	<input type="checkbox"/> 젤라틴 용액을 준비하고, 초임계 지용성 녹차추출액 원유은 충전탱크에 채운다.
3	충진과정(filling)	<input type="checkbox"/> 2ml 젤라틴 연질캡슐에 충전
4	포장과정(packaging)	<input type="checkbox"/> 박스에 포장하여 보관



<사진> 표준 매뉴얼에 따라 제조된 폴리코사놀 10mg/ea 함유 샘플

(3). 색도 측정

녹차 폴리코사놀 제조를 위한 최적 조건 확립과 표준화 매뉴얼에 따라 시판이 가능한 녹차 폴리코사놀 샘플을 제조하였다. 샘플은 제조 공정 매뉴얼에 따라 제조하였다. 각 시료 3 g을 취한 후 색차계 (Colorimeter, CM-3500d, Konica Minolta, Japan)를 이용하여 L(명도), a(적색도), b(황색도)값을 측정하였으며, 색도값 ΔE 는 다음식에 의하여 계산하였다.

$$\Delta E = [(L_{\text{sample}} - L_{\text{standard}})^2 + (a_{\text{sample}} - a_{\text{standard}})^2 + (b_{\text{sample}} - b_{\text{standard}})^2]^{0.5}$$

흰색표준판의 기준 표준값은 다음과 같다. (L= 92.93, a= -0.83, b= -0.89).

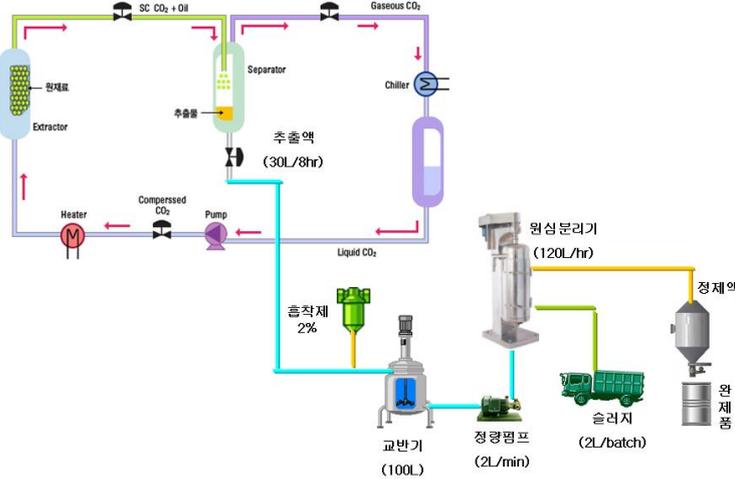
Table 2. The changes of color (L, a, b and ΔE value) of 5 kinds of green tea sample oils.

No.	L값	A값	B값	ΔE
1차	13.55	3.6	10.1	80.25951283
2차	13.03	3.61	9.96	80.75547102
3차	14.01	3.44	10.79	79.89381515
4차	13.48	3.8	11.08	80.47993725
5차	8.2	4.18	9.78	85.54602212
Ave.	12.46±2.15	3.73±0.26	10.35±0.51	81.37906426

(4). 녹차 업 초임계 지용성 추출액 생산 공정도

초임계 추출 및 원심분리 공정도

◎ 초임계 이산화탄소 추출 공정



나. 인체적용 시험

	기능성 혈중 콜레스테롤 개선		
사업책임자	(주)세원씨엔에스 대표 임승연		
수행기관	상계 백병원 내과과장 교수 이선영		
CRO	(주)네오뉴트라		
연구제목	녹차추출물의 혈중 콜레스테롤에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위 배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험		
연구목적	총콜레스테롤, 지질대사지표 검사, 동맥경화지수, 신체계측지표, 지질산화지표로 평가되는 녹차추출물의 혈중 콜레스테롤에 대한 유효성 및 안전성을 플라세보 섭취와 비교 평가		
연구유형	인체적용시험	IRB 구성 및 승인	Y
연구설계	Double-blind (이중눈가림)	Randomized (무작위배정)	Placebo-controlled (위약대조)
대상자 선정기준	만20세 이상 75세 이하인 성인 남녀로서, 공복채혈 검사에서 총콜레스테롤 200mg/dL 이상 인 자, 본 연구에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자 (섭취군 별 30명씩 총 60 명)		
디자인	대조군	위약(placebo) : 덱스트린 등, 1일 2회 (4g/d) : 1회 2캡슐, 아침/저녁 식후 섭취	
	시험군	본약 : 녹차추출물, 1일 2회 (4g/d) : 1회 2캡슐, 아침/저녁 식후 섭취	
	섭취기간	12주	
	식이조절	평상시 식이습관 유지	
바이오마커	1차 평가변수 : 총콜레스테롤 2차 평가변수 : 지질대사지표 검사(LDL-콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤, Non-HDL-콜레스테롤, Free fatty acid, Apo A1, Apo B, Lp(a), hs-CRP), 동맥경화지수 (총콜레스테롤/HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤/HDL-콜레스테롤, 중성지방/HDL-콜레		

	스텔, (총콜레스테롤-HDL-콜레스테롤)/HDL-콜레스테롤, Apo B/Apo A1), 신체 계측지표(체중, 체질량지수, 허리둘레, 엉덩이둘레, 허리-엉덩이둘레비), 지질산화지표(Oxidized LDL)
시험결과	[1] 1차 유효성 평가 항목 - 총콜레스테롤: 시험군에서 섭취 전에 비해 섭취 12주 후 감소하는 추세이나, 두 섭취군 간 비교 시 통계적으로 유의한 차이가 없음 [2] 2차 유효성 평가 항목 - HDL-콜레스테롤: 시험군과 대조군에서 방문에 따라 유의하게 증가 (p=0.034, p=0.034) 하였으나, 두 섭취군 간 비교 시 통계적으로 유의한 차이가 없음 - Lp(a): 시험군과 대조군에서 방문에 따라 유의하게 감소 (p<0.0001, p=0.002) 하였으나, 두 섭취군 간 비교 시 통계적으로 유의한 차이가 없음 - Apo A1: 시험군과 대조군에서 방문에 따라 유의하게 증가 (p=0.005, p=0.001) 하였으며, 두 섭취군 간 비교 시 통계적으로 유의한 차이 (p=0.045) [3] 안전성 평가 - 이상 없음
결론	12주간 녹차추출물을 섭취가 혈중 총콜레스테롤 증가 소견이 있는 성인에서 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, Lp(a), Apo A1이 개선되는 추세이나, 두 섭취군 간 비교 시 통계적으로 유의한 차이가 없었으며, 향후 확대된 인체적용시험을 통해 검증할 필요성이 있다고 사료됨
성과	혈중 총콜레스테롤 증가 소견이 있는 성인을 대상으로 녹차추출물 섭취 시 혈중 콜레스테롤 조절에 미치는 영향을 평가하기 위해 추가 분석 진행 중
향후계획	추가분석 이후, 개별인정 신청 여부를 결정할 계획

(1). 인체적용시험계획

(1)-1. 인체적용시험 방법

본 인체적용시험은 혈중 총콜레스테롤 수치가 높은 총 100 명의 연구대상자를 대상으로 하는 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 연구이다. 연구대상자는 인제대학교 상계 백병원에 방문하여 자의적 서면동의서를 작성한 후 스크리닝 검사를 받았으며 스크리닝 방문일로부터 2 주 이내에 1 차 방문하여 선정 및 제외기준을 재검토 받고 인체적용시험에 등록되었다. 연구대상자는 녹차추출물군과 플라세보군에 1:1 무작위배정 되어 1 차 방문일까지 기초평가(Baseline)를 완료한 후 시험용제품을 하루 2 회씩 매일 복용하면서 6 주마다 **인제대학교 상계 백병원에** 방문하여 인체적용시험계획서에 명시한 검사 등을 수행하며 12 주 동안 인체적용시험에 참여하였다.

(1)-2. 검사방법 및 대조제품의 선정

(1)-2-1. 연구대상자 동의서 (Informed Consent Document, ICD)

연구자는 인체적용시험 전반에 걸쳐 연구대상자가 가질 수 있는 질문에 대해 성실히 답변하였다. 또한 연구대상자의 인체적용시험 참여 지속 의사에 중요할 수 있는 새로운 정보가 입수되는 대로 적절한 시한 내에 이를 공유하고 연구 대상자가 인체적용시험 참여로 인한 위험 및 이익을 이해하는지 확인하였다. ICD 가 새로운 정보에 따라 갱신되는 경우 연구자는 갱신된 ICD 를 사용하여 연구대상자의 인체적용시험 참여 지속 의사를 다시 한 번 확인하였다. ICD

<p>인체적용 시험 제목</p>	<p>녹차추출물의 혈중 콜레스테롤에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험</p>
<p>목적</p>	<p>●1차 목적 총콜레스테롤(total cholesterol)로 평가되는 녹차추출물의 혈중 콜레스테롤에 대한 유효성을 비교 평가하고자 한다.</p> <p>●2차 목적 지질대사지표 검사, 동맥경화지수, 신체계측지표, 지질산화지표로 평가되는 녹차추출물의 혈중 콜레스테롤에 대한 유효성 및 안전성 비교 평가하고자 한다.</p>
<p>선정기준</p>	<p>1) 스크리닝 검사 당시 연령이 만 20 세 이상 75 세 미만인 자 2) 공복 채혈 검사에서 총콜레스테롤 200 mg/dL 이상 인 자 3) 본 연구에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자</p>
<p>제외기준</p>	<p>1) 공복채혈 검사에서 LDL-콜레스테롤 170 mg/dL 이상인 자 2) 첫 섭취일 전 6개월 이내에 지질저하제를 복용한 자(지질저하제의 종류-병용금지약물참조) 3) 체중이 50 kg 미만인 자 4) 심부전, 심근경색, 뇌졸중 등의 급성 중증 심혈관계 질환을 가진 자 5) 유전적 고지혈증, 급/만성 신부전, 신증후군 등의 신장질환을 가진 자 6) 당뇨병으로 진단 받은 자 7) 약물 및 건강기능식품에 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자 8) 인체적용시험용제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환(예: 크론병)이나 위장관계 수술(단, 단순맹장수술이나 탈장수술은 제외)의 과거력이 있는 자 9) 스크리닝 검사 전 2개월 이내에 항정신병 약물치료를 받은 경험이 있는 자 10) 약물 또는 알코올 남용 병력이 있는 자 11) 스크리닝 검사 전 2개월 이내에 타 인체적용시험에 참여한 자 12) 진단검사의학검사서 다음에 해당하는 결과를 보이는 자 ☞ AST, ALT > 참고범위 상한치의 2배 ☞ Serum Creatinine > 2.0 mg/dL 13) 임신 혹은 수유 중인 여성 14) 임신 가능성이 있는 가임 여성 중 적절한 피임법의 시행을 수용하지 않은 경우(단, 불임수술을 받은 여성은 제외) 15) 진단검사의학 검사결과를 비롯한 기타 사유로 인하여 시험책임자가 연구 참여에 부적합하다고 판단한 자(대사증후군이 있는 연구대상자의 병용약물은 시험책임자의 판단에 따라 병용을 인정함)</p>

연구대상자 수	총 100 명(섭취군별 50명씩 총 100 명)
시험방법	본 인체적용시험은 혈중 총콜레스테롤 수치가 높은 총 100명의 연구대상자를 대상으로 하는 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 연구이다. 연구대상자는 인제대학교 상계 백병원에 방문하여 자의적 서면동의서를 작성한 후 스크리닝 검사를 받았으며 스크리닝 방문일로부터 3주 이내에 1회 방문하여 선정 및 제외기준을 재검토 받고 인체 적용시험에 등록되었다. 연구대상자는 녹차추출물군과 플라세보군에 1:1 무작위배정 되어 1차 방문일까지 기초평가(Baseline)를 완료한 후 시험용 제품을 하루 2회씩 매일 복용하면서 6주마다 인제대학교 상계 백병원에 방문하여 인체적용시험계획서에 명시한 검사 등을 수행하며 12주 동안 인체적용시험에 참여하였다.
섭취방법	○ 녹차추출물군 - 1일 2회, 1회 2캡슐, 아침/저녁 식후 경구섭취(4g/day, 녹차추출물 로써 4 g/day) ○ 플라세보군 - 1일 2회, 1회 2캡슐, 아침/저녁 식후 경구섭취(4g/day, 녹차추출물 로써 0 g/day)
평가기준 및 방법	○ 유효성 평가 1) 1차 유효성 평가 □ 총콜레스테롤(total cholesterol) 2) 2차 유효성 평가 □ 지질대사지표: LDL-콜레스테롤, 중성지방(triglyceride), HDL-콜레스테롤, Non-HDL-콜레스테롤, Free fatty acid, Apo A1, Apo B, Lp(a), hs-CRP □ 동맥경화지수: 총콜레스테롤/HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤/HDL-콜레스테롤, 중성지방/HDL-콜레스테롤, (총콜레스테롤-HDL-콜레스테롤)/HDL-콜레스테롤, Apo B/Apo A1 □ 신체계측지표: 체중, 체질량지수(BMI), 허리둘레, 엉덩이둘레, 허리-엉덩이둘레비(WHR) □ 지질산화지표: Oxidized LDL ○ 안전성 평가 - 자 · 타각 증상 등 이상반응 모니터링 - 진단검사의학 검사 - 활력징후, 신체검진, 심전도
통계분석	□ 분석에 사용할 프로그램은 Window용 SAS 9.3를 이용하고, 통계학적 유의수준은 p값 0.05 미만으로 설정하였다. □ 집단 간 동질성 검정과 baseline의 동질성 검정은 Chi-Square test or Fisher's exact test와 Independent t-test를 이용하였다. □ 유효성 분석/안전성 분석 - 평가 항목의 검사결과를 전 후 비교 시 각 섭취군 내, 군 간

	<p>Independent t-test, Paired t-test 등을 적용하여 검정하였다. 단, 동질하지 않은 항목은 covariate로 보정하여 ANCOVA를 실시하였다.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 섭취군의 반복측정에 대해서 각 섭취군 내, 군 간 RMANOVA/ Linear mixed model 등을 적용하였다. 단, 동질하지 않을 경우 RM-ANCOVA를 실시한다. 시점 간 차이는 Contrast test로 분석하였다. - 인체적용시험기간 중 인체적용시험용제품 관련 이상반응 연구대상자의 비율은 각 섭취군에 따라 요약제시하며, Fisher's exact test 를 적용하여 분석하였다. - 단, 정규성검정을 통하여 정규성 만족을 하지 못할 경우, 비모수적 분석방법을 이용하였다(각 섭취군 내, 군 간 Wilcoxon signed-rank test, Mann-Whitney test 등).
<p>결론</p>	<p>본 인체적용시험은 녹차추출물 섭취가 혈중 콜레스테롤 개선에 미치는 효과와 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 연구이다.</p> <p>본 인체적용시험의 종료목표 연구대상자 수는 100명이며, 총 194명의 자원자가 서면동의서를 자발적으로 작성한 후 스크리닝 검사를 받았고, 연구대상자 적합성 평가를 통해 총 98명이 적격 연구대상자로 선정되었다. 선정된 연구대상자는 이중눈가림 방법을 통해 녹차추출물군, 플라세보군에 1:1무작위배정 되어 본 인체적용시험에 참여하였다.</p> <p>시험자는 모든 연구대상자를 대상으로 시험계획서에 정해진 바에 따라, 지질대사지표 검사, 동맥경화지수, 신체계측지표, 지질산화지표 등 유효성 평가와 진단검사의학 검사를 비롯한 안전성 평가를 시행하였다. 유효성 평가를 위한 주 분석군은 계획서 순응 연구대상자군(Per protocol Set)으로써 녹차추출물군 30명 중 2명, 플라세보군 30명 중 2명이 중도 탈락함에 따라, 총 56명(녹차추출물군 28명, 플라세보군 28명)의 연구대상자를 대상으로 유효성 평가 분석을 시행하였다. 안전성 평가를 위한 주분석군은 인체적용시험에 참여하여 최소 1회 이상 시험용 제품을 섭취한 연구대상자군(safety군)이었다.</p> <p>CONFIDENTIAL</p> <p>본 인체적용시험은 Good Clinical Practice(GCP)를 준수하여 수행되었습니다. 이 성적서는 기밀사항이며, 의뢰자의 승인 없이 다시 작성되거나 공개될 수 없습니다.</p>

는 연구대상자가 인체적용시험에 참여하기 이전에 쉬운 용어를 사용하여 인체적용시험 참여에 따르는 위험 및 이익을 연구대상자에게 설명하기 위해 사용되었으며, 연구대상자가 인체적용시험 참여에 따르는 위험 및 이익에 대해 만족 할 만큼 이해하고 인체적용시험에 참여하고자 하는지 문서화하기 위해 사용되었다.

연구자는 각 연구대상자가 제출한 연구대상자 동의서를 확인하였다. 여기에는 모든 인체적용시험계획서 상의 절차수행 및 인체적용시험용제품의 처방 이전에 적절한 서명 및 날씨가 기재되어야 하는 점이 포함되었다.

(1)-2-2. 스크리닝 번호 및 연구대상자 번호 부여

인체적용시험에 참여하고자 서면동의한 자원자에게 스크리닝 번호를 부여하였다. 스크리닝 번호는 S 로 시작하며, 전체 네자리, 숫자 세 자리로 구성되며 (S001~), 동의서를 받은 순서대로 부여하였다.

연구대상자번호 부여방법은 스크리닝 검사를 시행하여 본 인체적용시험의 연구대상자로서 적합하다고 판단되는 자를 선정하였고, 1 차 방문 시 최종통과 되면 통과 된 순서대로 무작위배정하여 연구대상자 번호를 부여하였다. 연구대상자 번호는 GT-R 로 시작하며, 전체 세자리, 숫자 두 자리로 일정한 규칙을 갖는다. 연구대상자 번호 숫자 부분의 의미는 다음과 같다. 첫 번째와 두 번째 숫자는 참여한 연구대상자의 순서를 나타냈다. 각 연구대상자에게 부여된 연구대상자 번호는 인체적용시험이 끝날 때까지 연구대상자를 인식하는 연구대상자식별코드(subject identification code)로 사용되었다.

(1)-2-3. 병력 및 약물 투여력 조사

연구대상자가 동의서에 서명한 시점에서 과거 3 년 이내 병력을 확인하였고, 증례기록서의 해당 페이지에 기록하였다. 인체적용시험기간 동안 질환이 처음으로 발생하거나 병발질환이 시험기간 동안 악화된 경우에는 이상반응으로 간주하고 기록하였다. 또한 모든 병용약물의 제품명 또는 성분명, 용량, 용법, 투여기간 등을 상세히 기록하였다.

(1)-2-4. 신체계측

① 신장, 체중 및 체질량지수(BMI)

신장과 체중은 시험기간 중 동일한 기계를 사용하였다. 신장은 단위를 cm 로 하였으며, 스크리닝 방문 시의 측정값으로 연구 종료 시까지 기재하였으며, 소수점 첫 째 자리에서 반올림하여 정수로 표기하였다. 체중은 단위를 kg 으로 하였으며, 소수점 첫째 자리까지 표기하였다(단, 소수점 둘째 자리까지 나오는 기계일 경우, 둘째 자리에서 반올림하여 첫째 자리까지 표기하였다). 체질량지수 (body mass index, kg/m²)는 체중(단위: kg)을 신장(단위: m)의 제곱으로 나눈 값이며, 소수점 둘째 자리에서 반올림하여 소수점 첫째 자리까지 표기하였다.

② 허리-엉덩이둘레비

허리둘레와 엉덩이둘레는 단위를 cm 로 하였으며, 줄자를 이용하여 각각 소수점 첫째자리까지 3 회 측정하여 측정치의 평균을 소수점 둘째 자리에서 반올림하여 소수점 첫째자리까지 표기하였다. 허리둘레는 배꼽을 기준으로 측정하며 엉덩이둘레는 측면에서 보아 엉덩이 뒷부분 중 가장 돌출된 부분을 수평으로 측정하였다. 허리-엉덩이둘레비(waist hip ratio, WHR)은 허리둘레를 엉덩이둘레로 나눈 값으로 소수점 셋째 자리에서 반올림하여 소수점 둘째 자리까지 표기하였다.

(1)-2-5. 진단검사의학 검사

진단검사의학 검사는 12 시간 이상 공복상태에서 채혈하여 측정하는 것을 원칙으로 하되, 시험책임자의 판단에 따라 달리 시행하였으며, 채취된 혈액은 분석 후 폐기하였다. 검사 항목은 다음과 같다:

진단검사의학 검사 항목

□혈액학적 검사

: WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets count

□혈액생화학적 검사

: total bilirubin, ALP, gamma-GT, ALT, AST, glucose, total protein, albumin, BUN, creatinine, creatine kinase(CK), LD(LDH), Na, K, Cl, Calcium, Phosphorus

□뇨 검사

: Specific gravity, pH, WBC, nitrite, protein, glucose, ketone, urobilinogen, bilirubin, blood, microscopic RBC/WBC

□스크리닝 전 최근 1 개월 이내의 심전도 및 진단검사의학 검사 결과로 대체할 수 있다. 추가로 필요한 진단검사의학 검사항목은 해당 인체적용시험 스크리닝 방문일에 검사하였다.

(1)-2-6. 지질대사지표 검사

지질대사검사는 12 시간 이상 공복을 유지한 상태에서 채혈하여 측정하는 것을 원칙으로 하고, 채취된 혈액은 분석 후 폐기하였다. 검사 항목은 다음과 같다:

지질대사지표 검사: 총콜레스테롤, LDL-C, 중성지방, HDL-C, Non HDL-C, Free fatty acid, Apo A1, Apo B, Lp(a), hs-CRP

* Non HDL-C 은 계산공식에 의해 산출하며, 소수점 첫째 자리에서 반올림하여 정수로 표기한다.

Non HDL-C= 총콜레스테롤 - HDL-C

*LDL-C 는 Friedwald 계산공식에 의해 산출하며, 소수점 첫째 자리에서 반올림하여 정수로 표기한다.

LDL-C= 총콜레스테롤 -(중성지방/5) -HDL 콜레스테롤

(1)-2-7. 동맥경화지수

동맥경화지수는 지질대사검사 항목을 이용하여 계산공식에 의해 하여 산출하였으며, 소수점 셋째 자리에서 반올림하여 소수점 둘째 자리까지 표기하였다.

항목은 다음과 같다:

동맥경화지수: 총콜레스테롤/HDL-C, LDL-C/HDL-C, 중성지방/HDL-C, (총콜레스테롤 - HDL-C)/HDL-C, Apo B/Apo A1

(1)-2-8. 지질산화지표 검사

혈액채취는 5ml 용 SST tube 1 개에 3ml 채취하고, Clotting 하기 위해 30 분 실온방치 후 3000rpm(or 1000xg), 10 분 동안 원심분리하였다. 분리된 혈청을 Separator(혈청분리관 or 1.5ml tube) 1 개에 0.5ml 이상을 옮긴 후 냉동(-70℃) 보관 후 위탁기관에서 측정하였으며, 채취된 혈액은 분석 후 폐기하였다. 지질산화지표 검사: Oxidized LDL

(1)-2-9. 대사체 검사

대사체란 단백질이 아닌 분자량 100-1000 사이의 분자들을 의미하며, 대사체 검사란 세포가 주

어진 인체 환경에서 만들어내는 모든 대사산물(metabolites)을 검사함을 의미하기 때문에 그 항목을 본 계획서에 명확히 예시하지는 못함 ***대사체 분석(metabolome analysis)을 위하여 혈장 2mL, 혈청 2mL, 혈구세포 1mL, 중간뇨 5mL 을 채집하여 초저온 냉동저장 후 위탁기관에서 측정한다. 채취된 혈액은 측정 후 폐기하였다. ---혈장분리를 위한 항응고제는 EDTA 를 이용하며, 혈청분리는 실온에 방치 후 3000rpm 에서 15 분 원심분리하였다.

(1)-2-10. 식이섭취조사

식이섭취조사는 식사기록법에 따르며 연구대상자는 스크리닝, 1차, 2차, 3차 방문 시 식이기록지를 교부 받아, 1차, 2차, 3차, 4차 방문 전 3일(주중 2일, 주말 1일) 동안 섭취한 음식물을 가능한 모두 기록하였으며, 시험자는 1차, 2차, 3차, 4차 방문 시 식이기록지를 회수하여 식이섭취조사 및 분석을 시행하였다.

(1)-2-11. 신체활동 조사

연구대상자는 1 차, 3 차 방문 시 Global Physical Activity Questionnaire(GPAQ)에 의한 신체활동조사 설문지를 작성하였다.

6.2.12. 연구대상자 이상반응 모니터링

이상반응에 대한 정보는 수시로 연구대상자에게 자발적인 보고를 하도록 하였으며, 그 외에 투약기간 동안 전화 방문과 정기 방문 시 시험담당자의 면담 및 문진 등 진료를 통하여 확인하였다. 이상반응 조사에는 발현일 및 소실일, 이상반응의 정도 및 결과, 인체적용시험용제품과 관련하여 취해진 조치 및 인체적용시험용제품의 인과관계, 인체적용시험용제품 이외 의심되는 약제명, 이상반응에 대한 치료여부 및 내용 등이 포함되었다.

(1)-2-13. 선정기준/ 제외기준 확인(연구대상자 적합성 평가)

스크리닝 방문 시에 수행한, 연구대상자 동의여부와 인구학적 조사, 병력 및 약품 투여력 조사, 이학적 검사소견, 심전도, 기타 검사결과를 종합하여 선정기준/제외기준에 해당하는 연구대상자 선정이 이루어졌는지 평가하여 기록하였다.

(1)-2-14. 무작위배정 및 인체적용시험용제품 제품 처방

선정기준/제외기준에 합당한 연구대상자를 녹차추출물군 군 또는 플라세보군으로 무작위배정하였다. 무작위배정은 선정기준/제외기준 평가일인 1 차 방문에 이루어졌으며, 이때 최초 섭취가 이루어졌다. 이후 섭취시작 6 주, 12 주에 연구대상자가 방문하여 녹차추출물/플라세보제품을 처방 및 반납하였다.

(1)-2-15. 반납제품 회수 및 순응도 확인

반납제품 회수 및 인체적용시험용제품의 섭취 순응도는 2 차 방문부터 매 방문 시마다 연구대상자가 지참하고 온 인체적용시험용제품 제품의 잔량을 관리영양사가 점검하였다. 섭취하고 남은 잔량은 반드시 약국에 반납하였고 수불장부를기록하였다. 각 방문 별 순응도는 100%를 초과할 수 없으며, 초과할 경우 100%로 간주하였다. 각 방문 별로 순응도를 계산하여 전체 순응도 평균치가 70% 이상 만족하지 못할 경우 분석에서 제외하였다. 순응도는 정수로 표기하였다.

(1)-2-16. 대조제품 선정의 근거

녹차추출물의 유효성과 안전성을 비교평가하기 위한 대조제품은 녹차추출물의 유효성분이 함유되어 있지 않은 플라세보이다. 동시에 혈중 콜레스테롤에 영향을 미치지 않을 것으로 판단되는 인체에 무해한 식품 성분을 사용하여 녹차추출물과 중량 및 열량이 거의 동일하게 만들어졌다.

(1)-3. 연구대상자의 선정

(1)-3-1. 선정기준

모든 연구대상자는 다음 기준을 만족하여 인체적용시험에 참여하였다.

- 1) 스크리닝 검사 당시 연령이 만 20 세 이상 75 세 이하인 성인 남녀
- 2) 공복채혈 검사에서 총콜레스테롤 200 mg/dL 이상 인 자
- 3) 본 연구에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자

(1)-3-2. 제외기준

연구대상자들이 다음 기준 중 어느 하나라도 해당될 경우 인체적용시험의 참여에서 배제되었다. 그러나, 위반 내용이 경미할 경우, 시험책임자의 판단 하에 허용하였다.

- 1) 공복채혈 검사에서 LDL-콜레스테롤 170 mg/dL 이상인 자
- 2) 첫 섭취일 전 6 개월 이내에 지질저하제를 복용하는 자(지질저하제의 종류-병용금지약물 참조)
- 3) 체중이 50 kg 미만인 자
- 4) 심부전, 심근경색, 뇌졸중 등의 급성 중증 심혈관계 질환을 가진 자
- 5) 유전적 고지혈증, 급/만성 신부전, 신증후군 등의 신장질환을 가진 자
- 6) 당뇨병으로 진단 받은 자
- 7) 약물 및 건강기능식품에 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자
- 8) 인체적용시험용제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환(예:크론병)이나 위장관계 수술(단, 단순맹장수술이나 탈장수술은 제외)의 과거력이 있는 자
- 9) 스크리닝 검사 전 2 개월 이내에 항정신병 약물치료를 받은 경험이 있는 자
- 10) 약물 또는 알코올 남용 병력이 있는 자
- 11) 스크리닝 검사 전 2 개월 이내에 타 인체적용시험에 참여한 자
- 12) 진단검사의학 검사에서 다음에 해당하는 결과를 보이는 자
 - ☞ AST, ALT > 참고범위 상한치의 2 배
 - ☞ Serum Creatinine > 2.0 mg/dL
- 13) 임신 혹은 수유 중인 여성
- 14) 임신 가능성이 있는 가임 여성 중 적절한 피임법의 시행을 수용하지 않는 경우 (단, 불임 수술을 받은 여성은 제외)
- 15) 진단검사의학 검사결과를 비롯한 기타 사유로 인하여 시험책임자가 연구참여에 부적합하다고 판단한 자(대사증후군이 있는 연구대상자의 병용약물은 시험책임자의 판단에 따라 병용을 인정함)

(1)-4. 방문 별 인체적용시험 진행 일정

(1)-4-1. 스크리닝 방문

이 연구에 참가하도록 선택된 연구대상자는 시험에 대한 설명을 듣고 다음 순서에 따라 평가를 받았다.

- ① 연구대상자를 시험에 참여시키기 전에 시험 과정을 설명하고, 연구대상자에게 서면 동의서를 받았다.
- ② 연구대상자는 순서대로 스크리닝 번호를 지정 받았다.
- ③ 연구대상자의 인구학적 정보와 병력(외과적 수술력을 포함한 과거력 및 현 병력) 및 약물투여력을 조사/기록하였다.
- ④ 음주 및 흡연력을 조사하였다.
- ⑤ 신체검진을 실시하였다.
- ⑥ 활력징후(혈압 및 맥박수) 및 신체계측을 실시하였다.
- ⑦ 지질대사지표 검사를 실시하였다.
- ⑧ 선정/제외기준을 만족시키지 못하는 연구대상자를 대상으로 이후 계획된 검사를 실시하지 않았다.
- ⑨ 동맥경화지수, 진단검사의학 검사를 실시하였다.
- ⑩ 심전도 및 임신반응 검사를 실시하였다.
- ⑪ 다음 방문일을 지정하였다.

(1)-4-2. 1 차 방문(0주)

이 방문은 스크리닝 방문일 이후에 이루어지며, 다음의 항목을 평가하였다.

- ① 약물투여력 및 의학적 상태변화를 확인하였다.
- ② 활력징후(혈압 및 맥박수)를 실시하였다.
- ③ 연구대상자 선정/제외기준을 최종평가하고, 무작위배정을 실시하였다. 단, 선정/제외기준 최종평가에 통과하지 못한 자는 이후 계획한 검사를 실시하지 않았다.
- ④ 지질산화지표 검사를 실시하였다.
- ⑤ 대사체분석을 위한 샘플뱅크를 실시하였다.
- ⑥ 식이섭취조사 및 신체활동조사를 실시하였다.
- ⑦ 인체적용시험용제품섭취방법에 대하여 교육을 하고, 인체적용시험용제품을 처방하였다.
- ⑧ 다음 방문일을 지정해 주었다.

(1)-4-3. 2 차 방문 (6주)

인체적용시험용제품의 최초 섭취 이후 6 주째에 2 차 방문이 이루어지며, 다음의 항목을 평가하였다.

- ① 약물투여력 변화를 확인하였다.
- ② 활력징후(혈압 및 맥박수)를 실시하였다.
- ③ 지질대사지표 검사, 동맥경화지수 검사를 실시하였다.
- ④ 연구대상자로부터 남은 인체적용시험용제품을 회수하여 개수를 확인하고 순응도를 평가하였다.
- ⑤ 이상반응 발생유무를 확인하였다.

- ⑥ 인체적용시험용제품 섭취방법에 대하여 교육을 하고, 인체적용시험용제품을 처방하였다.
- ⑦ 다음 방문일을 지정해 주었다.

(1)-4-4. 3 차 방문(12주)

인체적용시험용제품의 최초 섭취 이후 12 주째에 3 차 방문이 이루어지며, 다음의 항목을 평가하였다.

- ① 약물투여력 변화를 확인하였다.
- ② 음주 및 흡연력을 조사하였다.
- ③ 신체검진, 활력징후(혈압 및 맥박수), 신체계측을 실시하였다.
- ④ 지질대사지표 검사, 동맥경화지수 검사, 지질산화지표 검사, 진단검사의학 검사, 대사체 분석을 위한 샘플뱅크를 실시하였다.
- ⑤ 심전도 및 임신반응검사를 실시하였다.
- ⑥ 식이섭취조사, 신체활동 조사를 실시하였다.
- ⑦ 연구대상자로부터 남은 인체적용시험용제품을 회수하여 개수를 확인하고 순응도를 평가하였다.
- ⑧ 이상반응 발생유무를 확인하였다.
- ⑨ 필요한 경우 연구대상자에게 다음 방문일을 지정해 주었다.

(1)-5. 인체적용시험용 제품

(1)-5-1. 섭취방법 및 일정

- 녹차추출물군: 1 일 2 회, 1 회 2 캡슐, 아침/저녁 식후 경구섭취(4 g/day, 녹차추출물로써 4 g/day)
- 플라세보군: 1 일 2 회, 1 회 2 캡슐, 아침/저녁 식후 경구섭취(4 g/day 녹차추출물로써 0 g/day)

(1)-5-2. 섭취용량 설정 근거

녹차추출물(폴리코사놀)을 이용한 선행연구 결과 (21-23), 고콜레스테롤혈증인 자에게 녹차추출물(폴리코사놀)을 섭취시킨 결과 LDL-C, TC, Triglycerides, HDL-C, total cholesterol, Apo A1 을 개선시켰다. 또한 건강기능식품 기능성원료 개별 인정제품인 폴리코사놀-사탕수수 왁스 알코올의 섭취량이 5~20 mg (높은 혈중콜레스테롤 수치의 개선에 도움이 됩니다 - 기타기능 D)이며, 국내외에서 판매되고 있는 폴리코사놀 제품의 일일 섭취량이, 국내에서는 10~400 mg/일이며, 국외에서는 10~20 mg/일로 섭취되고 있다. 따라서 선행연구 결과 및 섭취경험 등을 토대로, 본 연구에서는 일일 섭취량을 녹차추출물로서 4 g/일 (폴리코사놀로써 10 mg/일)으로 설정하고자 한다.

(1)-5-3. 인체적용시험용 제품선정

- 녹차추출물 및 플라세보
 - 성상 및 제형: 짙은 녹색의 유상(연질캡슐)
 - 사용기간: 24 개월

- 저장방법: 실온
성분 녹차추출물(%) 플라세보(%)
녹차추출물 100 -
대두유 - 99
천연색소(치자황색소, 홍화황색소) - 1
합계 100 100

(1)-5-4. 배정방법 및 이중눈가림

무작위배정은 이중눈가림 단계에서 사용되어 연구대상자의 투여군 배정 시 편견을 피하고, 각 투여군마다 알려지거나 미지수인 연구대상자의 특징(즉, 인구학적 특성과 기초평가일 특성치)이 골고루 균형을 이뤄 투여군 간의 통계적비교의 유효성을 증가시키기 위함이며, 이중눈가림 투여는 자료수집과 인체적용시험 종료 시점의 평가에서 잠재적인 편견을 줄이기 위해 사용되었다.

인체적용시험 기간 동안 이중눈가림을 유지하기 위해 연구자나 연구대상자 본인이 연구대상자의 무작위배정 정보를 알 수 없어야 함으로 무작위배정 코드는 의뢰자가 유지 보관하는 것을 원칙으로 하였다. 또한 모든 연구대상자들이 인체적용시험을 완료하고 자료가 locking 되기 전에는 이중눈가림을 해제하지 않았으며, 이중눈가림을 해제한 경우 해제하게 된 날짜, 시간, 이유를 증례기록서와 근거문서의 적절한 곳에 문서화하였다. 의뢰자로부터 받은 눈가림 코드 해제 확인 서류 복사본은 근거문서에 보관하였다.

(1)-5-5. 과거 병력 및 병용 투여

(가). 과거 병력

연구대상자가 동의서에 서명한 시점에서, 문진 시 3 년 이내에 가지고 있는 과거 병력을 증례기록서의 해당 페이지에 기록하였다. 시험기간 동안 질환이 처음으로 발생하거나 병발질환이 시험기간 동안 악화된 경우에는 이상반응으로 간주되고 증례기록서의 이상반응 페이지에 기록하였다.

(나). 병용가능 약물

- 연구대상자가 시험에 참여하기 4 주 이전부터 복용하고 있던 약물 중 본 시험의 결과 해석에 영향을 미치지 않을 것으로 판단되는 병용약물(제품)은 연구책임자의 판단 하에 허용하였다.
- 기타 질환 또는 이상반응의 치료를 목적으로 일과성으로 사용되는 약제는 담당 의사와 상의를 통하여 병용 투여하였다.
- 시험책임자의 판단 없이 임의로 투약한 약물이 시험의 유효성 평가에 영향을 줄 수 있다고 예상되는 경우 이 연구대상자는 탈락하였다. 투여한 모든 제품 및 투여사유는 반드시 증례기록서에 기재하였고 시험책임자가 서명하였다.

(다). 병용금지 약물

다음에 열거하는 약물은 시험기간 동안 병용투여를 금지하였다.

- 사이클로스포린, 전신용 이트라코나졸 또는 케토코나졸, 에리스로마이신, 텔리스로마이신, 클레리스로마이신, 네파조돈, 아미오다론, 베라파밀 또는 다나졸

- 스타틴류 또는 콜레스테롤합성(HMG-CoA 환원효소)억제제, 우루소 성분(UDCA, Ursodeoxycholic acid)을 포함하는 담즙산배설촉진제, 니아신과 피브레이트 제제
- 혈압약(β -blocker 계열) -아세부톨롤(썩트랄), 아테놀올(테놀민), 벡탁솔롤(켈론), 비소프롤롤(제베타), 카르텔롤(칼트롤), 메트프롤롤(로프레소, 토프롤 XL), 나도롤(비스켄), 프로프라놀롤(인데랄, 인데랄 LA), 티모롤(브로카드론) 등
- 이노제(싸이아자이드계열, 루프 이노제, 칼륨 보존성 이노제 등)
- 경구용 코티코스테로이드제
- 혈중 지질, 콜레스테롤에 영향을 줄 수 있는 psyllium, 다른 섬유성지사제 및 일반의약품
- 혈중 콜레스테롤 개선 건강기능식품(대나무잎추출물, 보리 베타글루칸추출물, 보이차추출물, 사탕수수 왁스알코올, 스피루리나, 식물스타놀에스테르 등)
- 기타 시험책임자가 인정하지 않는 제제나 제품

연구대상자의 다른 의학적 증상 치료를 담당하는 의사의 판단에 따라 인체적용시험 기간 중 연구대상자의 치료를 위해 병용금지 약물의 사용이 필요한 경우에 해당 연구대상자는 즉시 인체적용시험을 중단하였으며, 증례기록서의 마지막 페이지에 관련내용을 자세히 기록하였다.

(1)-5-6. 인체적용시험 순응도

인체적용시험용제품의 섭취상황에 대하여 2 차 방문과 3 차 방문(종료 방문)시 연구대상자에게 섭취 후 남은 인체적용시험용제품을 지참하고 방문하도록 지도하여 연구대상자가 지참하고 온 인체적용시험용제품의 잔여량을 반납 받고 순응도를 확인하였다. 연구대상자가 지참하고 온 잔여량은 반드시 약국에 반납하여 수불장부를 기록하여야 하였다.

(1)-6. 유효성 및 안전성 관련 변수

(1)-6-1. 유효성 평가 변수

●1 차 유효성 평가변수

총콜레스테롤(total cholesterol)

●2 차 유효성 평가변수

지질대사지표 검사: LDL-콜레스테롤, 중성지방(triglyceride), HDL-콜레스테롤, Non-HDL-콜레스테롤, Free fatty acid, Apo A1, Apo B, Lp(a), hs-CRP 동맥경화지수: 총콜레스테롤/HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤/HDL-콜레스테롤, 중성지방/HDL-콜레스테롤, (총콜레스테롤-HDL-콜레스테롤)/HDL-콜레스테롤, Apo B/Apo A1 신체계측지표: 체중, 체질량지수(BMI), 허리둘레, 엉덩이둘레, 허리-엉덩이둘레비(WHR) 지질산화지표: Oxidized LDL

(1)-6-2. 안전성 평가 변수

●자타각증상 등 이상반응(Adverse Events; AE)

●진단검사의학 검사 결과

●활력징후, 신체검진 및 심전도

CNS-HL-GT Confidential January 2015, 27

□자 · 타각 증상 등 이상반응

(가). 이상반응의 중증도 (Severity) 평가

1 = 경증

(Mild)

연구대상자가 거의 느끼지 못할 정도로 정상적인 일상생활(기능)을 저해하지 않는 정도. 대부분 치료가 필요하지 않는 정도

2 = 중등도

(Moderate)

연구대상자가 불편감을 느낄 수 있으며, 정상적인 일상생활(기능)을 저해하는 정도. 연구대상자가 시험을 계속할 수는 있으나 치료가 필요할 수도 있는 정도

3 = 중증

(Severe)

연구대상자가 매우 불편하여 일상생활(기능)이 불가능하고, 시험의 지속적인 참여가 불가능한 정도. 치료나 입원이 필요할 수 있는 정도

(나). 이상반응의 인과관계(relationship) 평가

관련 없음

(Not related)

인체적용시험용제품 사용과 관련되지 않은 이상반응 - 연구대상자가 인체적용시험용제품을 섭취하지 않은 경우

- 인체적용시험용제품 섭취와 이상반응 발현간의 시간적 순서가 타당하지 않은 경우
- 이상반응에 대해 다른 명백한 원인이 있는 경우

확실치 않음

(Doubtful)

이상반응에 대한 다른 대체설명이 더 가능성이 큰 경우, 예를 들어 병용약물, 동반질환 또는 시간적으로 불 때 인과관계의 가능성이 적은 이상반응

- 이상반응에 대해 보다 가능성 있는 원인이 있는 경우
- 섭취중단 결과(실시한 경우)가 음성이거나 모호한 경우
- 재 섭취 결과(실시한 경우)가 음성이거나 모호한 경우

확실치 않음

(Doubtful)

이상반응에 대한 다른 대체설명이 더 가능성이 큰 경우, 예를 들어 병용약물, 동반질환 또는 시간적으로 불 때 인과관계의 가능성이 적은 이상반응

CNS-HL-GT Confidential January 2015 28

- 이상반응에 대해 보다 가능성 있는 원인이 있는 경우
- 섭취중단 결과(실시한 경우)가 음성이거나 모호한 경우
- 재 섭취 결과(실시한 경우)가 음성이거나 모호한 경우

관련이 있을 가능성이 있음

(Possible)

인체적용시험용제품 사용이 원인이 될 수 있는 이상반응. 예를 들어 병용약물, 동반질환에 의한 것인지 확실하지 않음. 시간적으로도 타당성이 있으며, 따라서 인과관계를 배제할 수 없는

경우.

- 인체적용시험용제품을 섭취하였다는 증거가 있는 경우
 - 인체적용시험용제품 섭취와 이상반응 발현 간의 시간적 순서가 타당한 경우
 - 이상반응이 다른 가능성 있는 원인들과 같은 수준으로 인체적용시험용제품에서 기인한다고 판단되는 경우
 - 섭취중단(실시한 경우)으로 이상반응이 소실된 경우 매우 가능성이 높음(Very likely)
- 인체적용시험용제품의 기여 가능성이 있는 이상반응으로 명시된 이상반응으로, 다른 대체 설명에 의해서 합리적으로 설명될 수 없는 경우로서, 시간에 따른 관련성이 매우 설득력이 있는 경우 (섭취 중단과 재 섭취로 확인됨).
- 인체적용시험용제품을 섭취하였다는 증거가 있는 경우
 - 인체적용시험용제품 섭취와 이상반응 발현간의 시간적 순서가 타당한 경우
 - 이상반응이 다른 어떤 이유보다 인체적용 시험용 제품 섭취에 의해 가장 개연성 있게 설명되는 경우
 - 섭취중단(실시한 경우)으로 이상반응이 소실된 경우
 - 재 섭취결과(실시한 경우)가 양성인 경우
 - 이상반응이 인체적용시험용제품 또는 동일계열의 제품에 대해 이미 알려져 있는 정보와 일관된 양상을 보이는 경우

CNS-HL-GT Confidential January 2015 29

(다). 이상반응과 관련하여 취해진 조치(Action Taken)

0 취해진 조치 없음(No action taken)

1 인체적용시험용제품의 일시적 섭취 중단(Study product temporarily interrupted)

2 인체적용시험용제품의 섭취 중단(Study product permanently discontinued)

3 치료약물 병용 섭취(Concomitant medication taken)

4 비약물치료(Non-drug therapy given)

5 입원 / 입원 기간의 연장(Hospitalization / Prolonged hospitalization)

연구책임자는 시험 시작일로부터 시험 종료 후 30일 이내까지 발생한 이상 반응을 보고한다. 중대한 이상반응의 기준을 만족시키는 이상반응은 “중대한 이상반응보고서 양식” 을 사용하여 보고하였다. 연구대상자가 시험을 완료 (추적관찰 포함)한 후 30일 이내에 연구자에게 자발적으로 보고하는 중대한 이상반응도 위와 같이 보고한다.

이상반응 기록: 이상반응의 심각성, 발현 정도 또는 투여제품과의 연관성과 관계없이 모든 이상반응은 근거문서와 증례기록서에 의학적 용어로 기록되었다. 징후 및 증상이 일반적인 병인에서 기인할 때 가능한 경우 이에 대한 진단이 실시되었다. 연구자는 증례기록서에 이상반응과 인체적용시험용 제품 투여 사이의 관련성에 관한 소견을 기록하였다. 이상반응 관리를 위해 요구되는 모든 측정 방법들은 의뢰자의 지시사항에 따라 근거문서에 기록되었다.

연구책임자/담당자의 책무: 시험 중 발생한 모든 중대한 이상반응은 연구책임자/담당자에 의해서 인지된 후 24 시간 이내에 해당 의뢰자의 연락 담당자에게 보고한다. 중대한 이상반응은 중대한 이상반응 보고서 양식을 통해 의뢰자 (필요한 경우 IRB)에게 전달되며, 이는 연구담당자에 의해 서명된다. 중대한 이상반응의 첫 보고는 이메일, 팩스나 전화로 하였으며, 전화 보고 이후 중대한 이상반응에 대한 보고는 당일 근무일 이내에 CNS-HL-GT

연구담당자에 의해서 중대한 이상반응 보고서 양식을 작성/완료하여 전송한다.

(1)-7. 자료의 질 보증

인체적용시험 자료의 정확성 및 신뢰성을 보증하기 위한 조치로는 적합한 자격요건을 가진 인체적용시험자와 시험기관을 선정하여 인체적용시험이 실시되기 이전에 인체적용시험자 및 담당자에 의한 인체적용시험계획서의 검토, 인체적용시험 의뢰자에 의한 주기적인 시험기관 모니터링 방문, 검사실로부터 얻은 인체적용시험 자료들을 인체적용시험 의뢰자에게 자료파일로 전송하는 일등이 포함되었다. 혈액, 혈청 및 소변 샘플의 수집, 준비와 운송에 대한 서면으로 된 지시사항이 제공되었다. 인체적용시험 시작 전에 증례기록서 완성지침이 제공되고, 인체적용시험 담당자들 사이에서 검토되었다. 인체적용시험 의뢰자는 시험기관 방문 동안, 그리고 증례기록서가 의뢰자에게 회수된 후에 증례기록서의 정확성과 완결성을 검토되었다. 내용이 일치하지 않을 때에는 인체적용 시험자 또는 담당자와 함께 적절한 방법으로 해결하였다. 자료는 인체적용시험 데이터베이스로 보내져 정확성을 확인 받았다.

(1)-8. 인체적용시험 계획서의 통계적 분석방법 및 연구대상자 수

(1)-8-1. 통계적 분석방법

본 인체적용시험의 연구대상자로부터 얻어진 자료는 크게 Safety군, ITT(intention-to-treat)군과 PP(per protocol)군으로 분석하였다.

- Safety군은 인체적용시험에 참여하여 최소한 1회 이상 인체적용시험용제품을 섭취한 연구대상자를 대상으로 분석하였다.
- ITT군은 인체적용시험용제품 섭취 후, 최소한 1회 이상 주 평가변수에 대한 측정이 이루어진 연구대상자를 대상으로 하였다.
- PP군은 ITT군에 포함되는 연구대상자 중 인체적용시험 계획서에 따라 인체적용시험을 완료한 연구대상자를 대상으로 분석하였다.
- 유효성 평가에 대한 자료는 PP군을 주 분석대상으로 하되, ITT군을 추가적으로 분석하여 유효성을 평가하였다. 안전성 평가에 대한 자료는 Safety군에 대해 분석하여 본 인체적용시험용 제품에 대한 안전성을 평가하였다.

(가). 유효성 분석

평가 항목의 검사결과를 전 후 비교 시 각 섭취군 내, 군 간 Independent t-test, Paired t-test 등을 적용하여 검정하였다. 단, 동질하지 않은 항목은 covariate 로 보정하여 ANCOVA 를 실시하였다.

섭취군의 반복측정에 대해서 각 섭취군 내, 군 간 RM-ANCOVA/Linear mixed model 들을 적용하였다. 단, 동질하지 않을 경우 RM-ANCOVA 를 실시하였다. 시점 간 차이는 Contrast test 로 분석하였다.

인체적용시험기간 중 시험제품 관련 이상반응 연구대상자의 비율은 각 섭취군에 따라 요약제시 하였으며, Fisher's exact test 를 적용하여 분석하였다.

단, 정규성 검정을 통하여 정규성 만족을 하지 못할 경우, 비모수적 분석방법을 이용하였다(각

섭취군 내, 군 간 Wilcoxon signed-rank test, Mann-Whitney test 등).

(나). 안전성 분석

안전성 평가에 대한 일차적 집단은 적어도 1 회 이상의 인체적용시험용제품을 섭취한 모든 연구대상자들이다.

●이상반응

인체적용시험 기간 동안 보고된 모든 이상반응을 도표화한 후 이상반응의 발생률을 구하였다. 시험군간 이상반응이 발생한 연구대상자의 비율을 산정하고, 카이제곱 검정(chi square test) 또는 피셔 검정법(Fisher's exact test)을 이용하여 분석하였다. 최종 평가에 영향을 미칠 수 있는 중요 변수를 통제할 필요가 있을 때에는 층화분석(Cochran-Mantel-Haenszel method) 또는 로지스틱 회귀분석을 이용하여 분석하였다.

●진단검사의학 검사, 활력징후, 심전도

진단검사의학 검사, 활력징후, 심전도 자료는 검사 유형별로 요약하였다.

계획된 시점의 각 분석 대상 검사자료에 대해서는 기술 통계량이 제시되었으며, 기초 평가일 결과로부터의 변화 정도가 제시되었다.

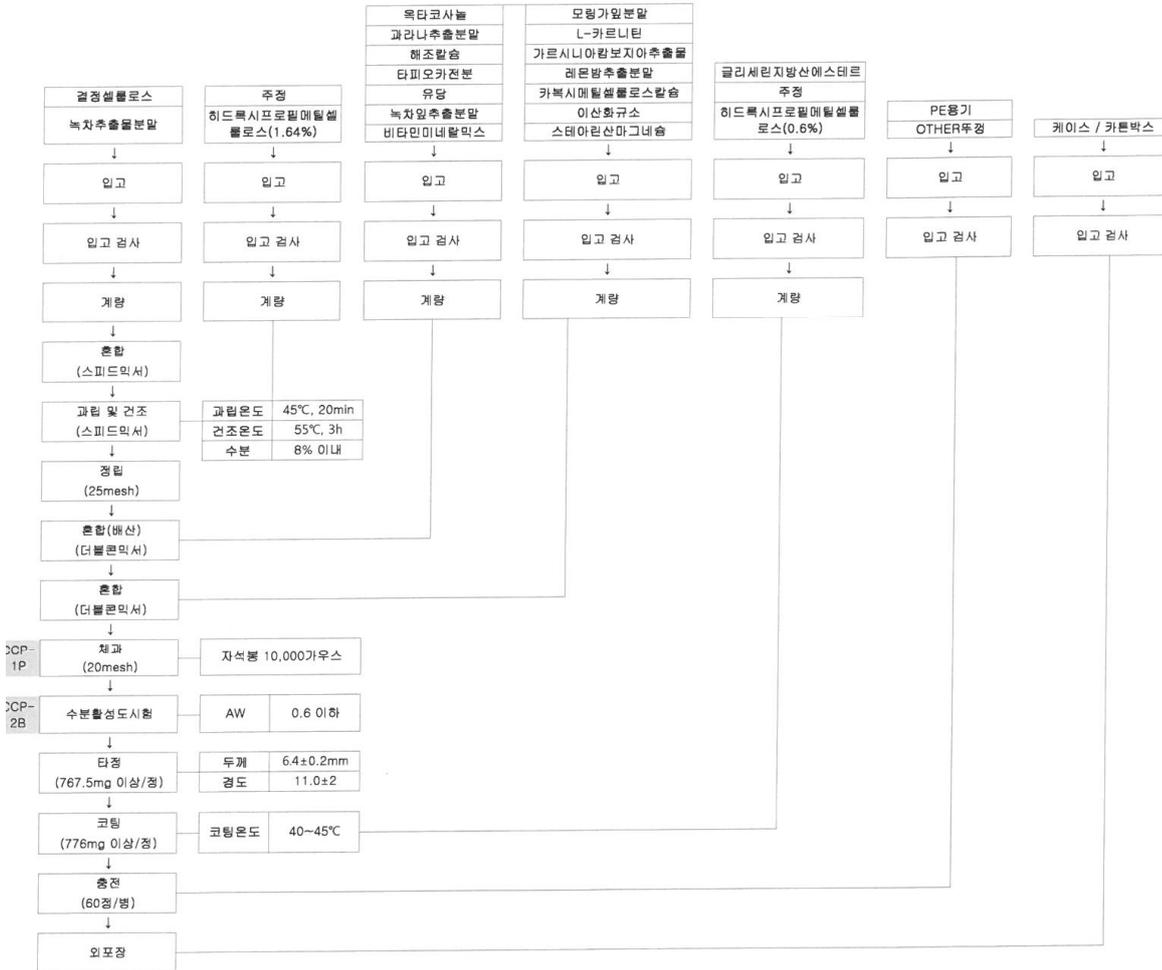
(1)-9. 유효성 평가

(1)-9-1. 분석에 포함할 연구대상자 군의 선정

유효성 평가는 과학적 모델을 이용하여 분석하였을 때 이들 자료로써 충분히 치료효과를 나타낼 수 있도록 인체적용시험 계획서에 따라 인체적용시험을 완료한 연구대상자, 즉 계획서 순응 연구대상자군(Per Protocol Set) 56명을 주 분석대상으로 분석하였다.

다. 건강기능식품개발 : 녹차 지용성물질을 함유한 시니어 헬스케어용 제품 제작

1. 품 명 : 원모 부스터
2. 원재료명 및 배합비



원료명	배합비(%)
옥타코사놀	10
녹차추출분말	20
과라나추출분말	28
해조칼슘	26
타피오카전분	13.5
유당	0.5
비타민믹스	2
	100

3. 포장단위 : 800mg*60C
4. 제품사진



본 스토리를 시작하기 앞서.

건강기능식품의 설명되는 내용 또는 스토리는 "일반 식품과 다르게" **건강기능식품 광고심의 협회에서 이행된 내용만** 광고를 할 수 있습니다. 따라서, 일반 식품처럼 자율광고가 어려운 점 양해 부탁드립니다. 최대한 광고기능심의협회에서 이행된 내용으로 정보를 전달 드릴 수 있도록 최선을 다하겠습니다.

원모어 부스터는 한국건강기능식품 광고심의협회를 통해 이행받은 내용만 광고를 하며, 어떠한 과대 광고 및 허위 광고를 하지않음 을 아래 심위번호로 약속합니다.

지치고 앓고 체력관리를 하고싶다! 남성들의 최대 고민! 지구력과 체지방 감소를 한번에 도움을 주는 원모어 부스터! 이제 스마트하게 운동하세요!



제품명 : 원모어 부스터

심위번호 : 191110906



열량	15 kcal
탄수화물	3g 1%
단백질	0.5g 1%
지방	0g 0%
나트륨	0mg 0%
옥타코사놀	10mg
카테킨	300mg

* 영양성분 기준치 : 1일 영양성분기준치에 대한 비율



<지용성 녹차 함유한 시니어 헬스케어용 건강기능성 식품 시제품 시안>

아이템개요	· 지역 농특산물 소재 이용 제조된 국내산 블렌딩 녹차
-------	--------------------------------

	<p>제품의 상품화 제고</p> <ul style="list-style-type: none"> · 소비자 기호에 적합한 블렌딩 원료의 맛, 향, 색 및 기능성 탐색을 통한 후보물질 선정 · 최적 블렌딩 조건 탐색 및 레시피 개발 및 제품화
진행단계	<input checked="" type="checkbox"/> 제품기획·설계 <input type="checkbox"/> 시제품제작 <input type="checkbox"/> 양산 <input type="checkbox"/> 판매
아이템 세부소개	자체 개발한 녹차 전처리 과정을 통해 풍미를 극대화 시킨 녹차 추출액을 강원도 자색옥수수 추출물을 첨가하여 색과 맛을 블렌딩하고 저분자 피쉬 콜라겐을 첨가하여 기능성을 추가함.
제품명(서비스명)	셀티
제품명(서비스)의 소개	우리 몸을 구성하는 세포의 건강을 위한 차란 뜻으로 녹차안에 들어있는 카테킨과 갈산 성분에 강원도 농업기술원에서 자체 개발한 자색옥수수 추출분말을 사용하여 녹차에 셀티만의 특이한 시그니처 색을 만들었으며 안토시아닌의 항산화 효과 등을 추가했고 셀티란 차를 마셔야 하는 이유를 더 주기위해서 최근 피부세포 재생을 위해 인기가 흡수가 빠른 저분자피쉬 콜라겐을 1회 용량당 1,000mg 추가 하면서 여성들에게 어필할 수 있는 경쟁력을 갖추



3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1절. 연구목표

3. 주관기관 :

- 녹차 지용성 물질의 최적 추출공정 확립 및 화장품 원료 최적화
- 녹차의 지용성물질로부터 폴리코사놀 성분분석
- 화장품제형의 항산화시험, 피부개선시험
- 인체적용시험을 실시하여 녹차폴리코사놀성분의 화장소재 개발

4. 제 1협동연구과제 :

- 녹차 지용성 물질의 최적 추출공정 확립 : 초임계이산화탄소추출법에 의한 녹차 지용성 물질의 최적 추출공정 확립
- 대형 초임계추출을 통한 녹차잎으로부터 지용성 물질 추출방법 최적화
- 녹차 초임계 추출물 중 흡착제를 이용한 벤조피렌 제거기술 개발
- 기능성식품 소재로서의 옥타코사놀의 대량생산 기술 개발 (수율 분석)

3. 제 2협동연구과제 : 블렌딩녹차 대량생산 제조공정 및 소비자 선호 블렌딩차 레시피 개발

블렌딩녹차 대량생산을 위한 차베이스 기준설정으로 균일화된 고품질 블렌딩녹차 제조를 위한 제다공정 정립으로 보성산 봄차, 여름차, 가을차를 이용한 소비자가 선호하는 기호성 및 기능성 블렌딩차 레시피 개발 및 상품화로 차 재배 농가의 소득증대에 기여코자 본 과제를 수행하였음.

4. 제 3협동연구과제 :

- 녹차 지용성물질을 이용한 기능성 식품 개발 및 제품 사업화
- 초임계 추출을 이용한 녹차 유래 기능성 원료의 검증
- 보성산 녹차 이용 기능성 및 편이성이 개선된 신개념 블렌딩차 제품 3종 개발
- 녹차 유래 폴리코사놀(옥타코사놀) 함유 기능성 식품 제품화 진행
- 재형 개발 2종 이상
- 제품화 3건 이상
- 농축 녹차 음료 제품 개발 및 시제품 3종 제조
- 녹차 폴리코사놀 제품 표준화 및 원료 등록 신청
- 건강기능성식품 원료 등록 추진

2절. 연차별 연구개발의 목표, 내용 및 달성도

구분	차년도	세부연구 개발 목표	달성도 (%)	연구 내용
----	-----	---------------	------------	-------

1차년	2017	- 시기별 블렌딩녹차 베이스차 평가 - 블렌딩녹차 원료표준화를 위한 베이스차 품질기준 설정	100%	- 봄차, 여름차, 가을차 이용 베이스차 원료 평가 - 시중 블렌딩녹차 3종 이상 설정된 기준에 따른 품질평가
2차년	2018	- 블렌딩녹차 대량생산(10kg) 제조공정 정립 - 기능성 기호성 블렌딩 녹차 부재료 소재 개발	100%	- 시기별 베이스차 원료표준화를 위한 대량생산 제조공정 구명 - 기능성 및 기호성 블렌딩녹차 부재료 소재 스크린 및 선발 - 블렌딩 베이스차 관능적 묘사분석 및 소비자 기호도 조사
3차년	2019	- 블렌딩녹차 레시피 개발 및 시제품 제조 3종	100%	- 기능성별 선호 블렌딩차 레시피 원료배합비 구명 - 신개념 포장기술 적용 블렌딩차 시제품 제조

3절. 연차별 연구개발의 정량적 성과(논문게재, 특허출원, 기타)

구 분	논문게재		산업재산권		학술발표		기술 이전 (무상)	농가 교육 세미나	영농 활용	품종개발		기술 지도	기술 지원	홍보
	SCI	비SCI	출원	등록	국내	국제				출원	등록			
당초목표 (전체)					2	1	1	1	2			2	2	
1년차 ('17)					1			1						
2년차 ('18)					1			2	1			1	1	
3년차 ('19)			3		1	1	1	1	3			1	10	
소계			3		3	1	1	4	4			2	11	
달성도 (%)			100		150	100	100	400	200			100	500	

4절. 연차별 연구개발의 정량적 성과 목록

세부과제명	과제책임자	성과물 유형	성과물명	성과물 주담당자	적용월	승인부
블렌딩녹차 대량생산 제조공정 및 소비자 선호 블렌딩차 레시피 개발	최정	학술발표 구두발표	전남지역 녹차 종류별 품질평가방법 및 등급화 기초연구 (‘17년 추계한국차학회)	오봉윤	2017년 10월 20일	승인
블렌딩녹차 대량생산 제조공정 및 소비자 선호 블렌딩차 레시피 개발	오봉윤	세미나 개최	블렌딩티 관능평가에 의한 품질평가 이론 및 방법 (‘17.12.22.)	오봉윤	2017년 12월	승인
”	오봉윤	학술발표	Composition and Sensory Characteristics of Boseong Green Tea by Harvesting Time and Mixing Ratio (‘18 한국식품과학회)	오봉윤	2018년 6월 27일	승인
”	오봉윤	영농활용 기술	블렌딩녹차 제조를 위한 베이스녹차 대량생산 제조방법 (농촌진흥청 영농교본)	오봉윤	2018년 12월	승인
”	오봉윤	홍보	고품질 차(茶)생산을 위해, 전문가 한자리에 (전업농신문 ‘18.4.5일자.)	오봉윤	2018년 4월 5일	승인
”	오봉윤	차전문가 교육	녹차 품질평가를 위한 관능평가 이론 및 묘사분석 (‘18. 3. 30.)	오봉윤	2018년 3월 30일	승인
”	오봉윤	농가교육	차제품 품질관리 식품법규 및 위생관리 (‘18. 11. 19.)	오봉윤	2018년 11월 19일	승인
”	오봉윤	농가 기술지원	시기별 베이스녹차 성분분석용 시료 및 블렌딩차 제품화 기술지원 - 차생산농가 : 다도락	오봉윤	2018년 1월 30일	승인
”	오봉윤	학술발표	수확시기별 및 블렌딩비율별 녹차의 성분 함량과 관능적 특성 (‘19 춘계 한국차학회)	오봉윤	2019년 6월4일	승인
”	오봉윤	학술발표	녹차 성분 함량과 관능적 묘사분석의 상관관계 (‘19 추계 한국차학회)	오봉윤	2019년 11월 8일	승인
”	오봉윤	학술발표	Flavor profile of greentea harvested at different seasons (‘19 한국식품과학회)	오봉윤	2019년 7월 27일	승인
”	오봉윤	농가 기술지원	녹차를 베이스로한 블렌딩녹차 상품화 기술지원 -차생산농가 : 다채	오봉윤	2019년 4월 23일	승인

세부과제명	과제책임자	성과물유형	성과물명	성과물주담당자	적용년월	승인부
"	오봉윤	영농활용기술	기억력개선 기능성 블렌딩차 레시피 및 상품 제조방법	오봉윤	2019년 12월	기관 제출
"	오봉윤	영농활용기술	면역력증진 기능성 블렌딩차 레시피 및 다양한 포장방법 적용	오봉윤	2019년 12월	기관 제출
" "	오봉윤	영농활용기술	항산화 기능성 블렌딩차 레시피 및 상품 제조방법	오봉윤	2019년 12월	기관 제출
"	오봉윤	상표	총명하도다차(茶) 출원번호 : 40-2019-0190725	오봉윤	2019년 12월	출원
"	오봉윤	상표	튼튼하도다차(茶) 출원번호 : 40-2019-0190724	오봉윤	2019년 12월	출원
"	오봉윤	상표	동안이도다차(茶) 출원번호 : 40-2019-0190726	오봉윤	2019년 12월	출원
"	오봉윤	홍보	전남농기원, 젊은 소비자가 선호하는 기능성 블렌딩차 제품 개발(농업경제신문)	오봉윤	2019년 12월 24일	보도
"	오봉윤	홍보	전남농기원, 기능성블렌딩차 개발(전남매일)	오봉윤	2019년 12월 23일	보도
"	오봉윤	홍보	전남농기원, 기능성 블렌딩 녹차 3종 개발 (남도일보)	오봉윤	2019년 12월 11일	보도
"	오봉윤	홍보	전남농기원, 젊은 소비자가 선호하는 기능성 블렌딩 차 제품 개발(Breaknews)	오봉윤	2019년 12월 11일	보도
"	오봉윤	홍보	전남농기원, 젊은 소비자가 선호하는 기능성 블렌딩차 제품 개발(WIKITREE)	오봉윤	2019년 12월 12일	보도
"	오봉윤	홍보	차산업연구소, 천연물 혼합 블렌딩 녹차 개발 (목포mbc 뉴스데스크)	오봉윤	2019년 12월 12DLF	보도
"	오봉윤	홍보	전남농기원, 기능성 블렌딩 녹차 3종 선봬 (한국농어민신문)	오봉윤	2019년 12월 17일	보도
"	오봉윤	홍보	전남농기원, 젊은 소비자가 선호하는 기능성 블렌딩차 제품 개발(한국농어촌방송)	오봉윤	2019년 12월 11일	보도
"	오봉윤	홍보	젊은 소비자 선호 기능성 블렌딩차 개발 (광주매일신문)	오봉윤	2019년 12월 12일	보도
"	오봉윤	홍보	동안이도다차, 총명하도다차 튼튼하도다차 (농촌여성신문)	오봉윤	2019년 12월 11일	보도

4장. 연구결과의 활용 계획

본 연구는 차 주산지인 전남 보성 특화자원인 녹차잎을 이용하여 산학연 융합의 **집중적인 상품화 연구개발**을 통하여 기능성과 기호성이 확보된 **고품질의 녹차 상품을 개발하여 제품화 및 사업화**하고, 국내산 차잎의 활용도 증진, 정보 제공 및 마케팅 프로그램의 구축을 통해 국내 차 시장 확대와 **보성산 차 산업의 활성화**를 목표로 소비자 선호 기능성 및 기호성 블렌딩 녹차 제품 3종을 개발하여 연구결과를 홍보하고, 산업화할 수 있도록 기술지원 희망업체에 유·무상 기술이전하여 산업화를 추진할 예정이다.

- (영농기술정보) 기억력개선 기능성 블렌딩차 레시피 및 상품 제조방법
- (영농기술정보) 면역력증진 기능성 블렌딩차 레시피 및 다양한 포장방법 적용
- (영농기술정보) 항산화 기능성 블렌딩차 레시피 및 상품 제조방법
- ☞ **영농활용기술은 차 재배 및 가공농가에 기술지원 현장활용 책자 발급시 수록 후 활용**
- (상표출원) 총명하도다차
- (상표출원) 튼튼하도다차
- (상표출원) 면역력증진차
- ☞ **상표출원은 상표등록 후 기술이전하여 기능성 차 제품 상품화에 활용**

(주)세원씨엔에스는 건강 기능성식품 판매업은 등록되었으며, 현재 (주)한풍네이처팜과 O.E.M 생산계약을 체결하였다. 1단계로, 2021년 12월 31일까지 식품원료 제조업 등록할 계획이다. 또한 녹차 지용성 물질 함유 기능성 식품 조성물 관련 3건의 특허를 출원하고, 지용성 녹차 성분의 효능성, 안전성, 신뢰성 검사를 마친 후, 건강기능성 식품 원료 생산을 위한 공장 부지를 전남 보성군에 구할 계획이다.

2단계로 원료 생산을 위한 공장을 2022년부터 건축하고, 설비 및 장비를 위한 투자를 진행할 계획이다. 현재 공장 부지 및 설비를 위하여 투자 유치를 진행하고 있으며, 생산설비를 완료한 후, 제품 출시를 통하여 시장 점유율을 확대하고자 한다. 또한 소비자 체험 홍보를 토대로 고령층의 수용성 조사를 면밀히 분석하여 제품 보완 및 제품의 다양화를 진행할 계획이다.



<녹차 10차 산업 달성을 위한 테마 파크 사업>

3단계로 녹차를 이용한 기능성 식품의 성공적인 사업화를 위하여 전남 보성군에 녹차 10차 산업 달성을 위한 테마파크를 준비하고자 한다. 1차 산업인 녹차 생산 농장을 확보하고, 2차 생산 산업인 녹차 가공

및 기능성 식품/기능성 식품 제품화를 진행하며, 3차 서비스 산업으로 녹차를 이용한 건강증진 서비스 사업 및 예절 교육을 실시할 수 있는 시설을 확보하고, 4차 녹차 문화 체험 및 관광 활성화를 기획하여 진행할 계획이다.

5장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

세계 기능성식품산업 중 미국과 유럽, 일본이 차지하는 비중이 세계시장에서 85%를 차지하며, 이와 같은 이유로 해외 기능성식품시장은 선진국을 중심으로 활성화 되었다. 기능성식품 시장이 형성되는 것은 주 소비층이라고 할 수 있는 노년층의 증가현상을 통해서도 일정부분 예측할 수 있다. 이들은 질병을 예방하고 오래도록 건강을 지속하기 위한 부분에 많은 관심을 가지고 있는 그룹들이라고 할 수 있다. 미국의 건강기능성 시장은 97년도 기능성식품이 약 125억 달러(53.9%), 자연식품 45억 달러(19.4%),유기식품 40억 달러(17.2%) 이 외 다이어트 식품 등이 약 22억 달러(9.5%)를 구성하여 기능성 식품이 전체 시장의 절반이상을 차지하고 있다. 전체 매출의 49%는 소매점에서 판매되며, 자연·건강식품 전문점 36%를 합하면 점포를 통한 매출의 합은 85%를 차지할 정도로 높다. 독립 전문점의 점포수를 확인하면 자연식품점은 2,840점포, 건강 식품점은 4,340점포, 비타민 및 미네랄 전문점은 2,610점포로 나타났다. 기능성식품 최대 점유율을 기록하고 있는 미국 내 다이어트·스포츠 제품인 에페드린의 부진 때문에 미국 건강 기능성기업 매출 1위인 Royal Numico사는 2002년 3사분기 결산에서 01년 3사분기보다 14.4% 하향했으며, 미국 최대건강식품소매점인 GNC의 매출 또한 7.8% 하향했다. 하지만 미국의 경우 인구 대비 과대체중인 경우가 60%일 정도로 심각한 상황이며 당뇨병 환자용 식품도 슈퍼 내 식품 코너에 별도로 진열될 정도로 기능성 식품에 대한 관심이 높다고 하겠다.

- 중국의 차산업은 차를 마시는 문화가 형성되어 있었고, 차산업의 6차 산업화가 이루어져, 소비자들이 체험하고 지속적으로 차를 마시는 문화가 정착되어 있었음. 중국은 차탕 감상회가 있는데, 특색있는 차를 우려서 마시는 일련의 찻자리 과정을 감상회라고 표현하며, 상품으로 가치를 두고 있었음.
- 중국은 남녀노소가 일상에서 차를 마시는 문화가 형성되어 있을뿐만아니라, 무아차회라는 기본 정신 “ 화합”을 드높이고 있어서, 차를 마시는 의미를 크게 부여하고 있었음, 중국은 우려 마시는 차를 번거로워하지 않았음
- 중국의 해외 차 수출 전략에 대한 벤치마킹이 필요하였는데 재미있고, 독특한 스토리텔링으로 차의 가치를 높이고 이것을 판매전략으로 활용하고 있었고 마케팅 전략으로 발효차에 대한 확인 할 수 없는 시간과 역사, 차의 신비로운 전설적인 이야기로 국내외 소비자들에게 홍보하고 있었다. 만약 우리나라에서 같은 방법으로 마케팅에 사용한다면, 허위 과대광고로 적발될 것이나, 중국은 그러한 것들이 모두 허용이 되는 나라였다.
- 안계철관음은 중국 청차 최대 생산지로, 양뿐만 아니라 고품질의 차 생산지이며, 다도체험 및 차탕 감상회를 통해 차를 마시는 문화가 정착되어 지역주민들의 다도가 일상생활화 되어 있었고, 다양한 맛과 향의 차를 활용한 다양한 음식, 차 관련 제품이 유통되고 있음. 천복명차와 같은 차 기업이 교육, 문화, 생산, 판매, 유통, 전통을 모두 연계하여 종합적 시스템이 움직이면서 차산업을 활성화가 이루어지고 있었다.

폴리코사놀은 각종 곡류, 과일 껍질, 사탕수수, 양, 벌집 등 왁스알코올에서 추출한 지방산으로서 최초 사탕수수에서 추출하였음. 그러나 사탕수수 5톤에서 폴리코사놀 250g이 추출될 정도로

추출수율이 낮아 비용 역시 고가임. 호주, 미국, 일본 등지에서 기능성식품으로 판매되고 있으며, 국내에서도 개별인정형 건강기능식품 및 고시형 건강기능식품(옥타코사놀로서)으로 제조 판매되고 있음. 기능성은 콜레스테롤 개선 및 혈행개선이며, 옥타코사놀의 기능성은 지구력 증진으로 판매되고 있음.

폴리코사놀은 각종 곡류, 과일 껍질, 사탕수수, 양, 벌집 등 왁스알코올에서 추출한 지방산으로서 최초 사탕수수에서 추출하였음. 그러나 사탕수수 5톤에서 폴리코사놀 250g이 추출될 정도로 추출수율이 낮아 비용 역시 고가임. 호주, 미국, 일본 등지에서 기능성식품으로 판매되고 있으며, 국내에서도 개별인정형 건강기능식품 및 고시형 건강기능식품(옥타코사놀로서)으로 제조 판매되고 있음. 기능성은 콜레스테롤 개선 및 혈행개선이며, 옥타코사놀의 기능성은 지구력 증진으로 판매되고 있음.

붙임. 참고문헌

- Beltrán G, Bucheli ME, Aguilera MP, Belaj A, Jimenez A. Squalene in virgin olive oil: screening of variability in olive cultivars. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 118: 1250-1253 (2016)
 - Budge SM, Barry, C. Determination of squalene in edible oils by transmethylation and GC analysis. *MethodsX* 6: 15-21 (2019)
 - Choi SJ, Park SY, Park JS, Park S, Jung MY. Contents and compositions of policosanols in green tea (*Camellia sinensis*) leaves. *Food Chem.* 204: 94-101 (2016)
 - Frega N, Bocci F, Lercker G. Direct gas chromatographic analysis of the unsaponifiable fraction of different oils with a polar capillary column. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69: 447-450 (1992)
 - Grigoriadou D, Androulaki A, Psomiadou E, Tsimidou MZ. Solid phase extraction in the analysis of squalene and tocopherols in olive oil. *Food Chem.* 105: 675-680 (2007)
 - He HP, Corke H. Oil and squalene in *Amaranthus* grain and leaf. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7913-7920 (2003)
 - He HP, Cai Y, Sun M, Corke, H. Extraction and purification of squalene from *Amaranthus* grain. *J. Agric. Food Chem.* 50:368-372 (2002)
 - Huang Z-R, Lin Y-K, Fang J-Y. Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. *Molecules* 14: 540-554 (2009)
 - Jung DM, Lee MJ, Yoon SH, Jung MY. A gas chromatography tandem quadrupole mass spectrometric analysis of policosanols in commercial vegetable oils. *J. Food Sci.* 76: C891-C899 (2011)
 - Lanzon A, Albi T, Cert A, Gracia J. Hydrocarbon fraction of virgin olive oil and changes resulting from refining. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71: 285-291 (1994)
 - Nergiz C, Celikkale DC. The effect of consecutive steps of refining on squalene content of vegetable oils. *J. Food Sci. Technol.* 48: 382-385 (2011)
 - Newmarks HL. Olive oil, and cancer risk: review and hypothesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 889: 193-203 (2006)
-
1. 손연숙 블렌딩을 통한 차의 품질 및 기능 향상에 관한 연구. *차문화·산업학* 제34집 2016. p. 1~26.
 2. 박성선, 서형주, 정은영, 박종대, 최정, 양성범 소비자 인지에 의한 녹차 품질 평가 요소의 계층적 중요도 설정 2011, 17(2), p 29~37.
 3. 보성군 녹차 관능평가 및 제다기술. 보성군, 한국국제차업연구소 2007. p.122
 4. 정인호 차 품평 중 관능검사에 대한 비교 고찰. 2005 한국차학회 춘계학술대회 p.9
 5. 양원모, 김구현, 최정 우리나라 차 소비자의 기호특성과 한국형 차 품평 기준 정립. *한국차학회지* 10(3) p. 37-51

6. 김광옥 녹차의 관능적 특성 및 소비자 기호도와의 관련성 (사)한국식품과학회 제9회 국제녹차심포지엄 2008
 7. 최정 한국녹차 품질평가 및 등급화 방법 전라남도농업기술원 한국차 품질기준 및 등급화 공청회 2010 p 33
 8. 천준길 한국의 차 품질평가 현황, 대한민국차품평회, 한국명차품평대회 2005
 9. 김영경 차의 관능검사 차 품질평가방법 현황 및 기준안 설정 2005 한국차학회 춘계학술대회 p. 49-56
 10. 정인호 차 품평 중 관능검사에 대한 비교 고찰 한중일의 관능검사를 중심으로. 차 품질평가 방법 및 기준안 설정, 한국차학회 춘계학술대회 2005 p 9~45
-
1. 박성선, 서형주, 정은영, 박종대, 최정, 양성범 소비자 인지에 의한 녹차 품질 평가 요소의 계층적 중요도 설정 2011, 17(2), p 29~37.
 2. 보성군 녹차 관능평가 및 제다기술. 보성군, 한국국제차엽연구소 2007. p.122
 3. 정인호 차 품평 중 관능검사에 대한 비교 고찰. 2005 한국차학회 춘계학술대회 p.9
 4. 양원모, 김구현, 최정 우리나라 차 소비자의 기호특성과 한국형 차 품평 기준 정립. 한국차학회지 10(3) p. 37-51
 5. 김광옥 녹차의 관능적 특성 및 소비자 기호도와의 관련성 (사)한국식품과학회 제9회 국제녹차심포지엄 2008
 6. 최정 한국녹차 품질평가 및 등급화 방법 전라남도농업기술원 한국차 품질기준 및 등급화 공청회 2010 p 33

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.