

663.94
6-3

GOVP1200518518

GA0393-0248

최 종
연구보고서

우리나라 녹차와 타국산 녹차의
차별화를 위한 특성비교 및
기능성 제품의 개발

663.92

Chemical and physiochemical properties
of Korean green tea and development of functional
foods from its active components

송희태영로

연구기관
한국식품개발연구원

농 립 부

T0011053

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “우리나라 녹차와 타국산 녹차의 차별화를 위한 특성비교 및 기능성 제품의 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003. 8. 30

주관연구기관 : 한국식품개발연구원

연구책임자 : 김 상 희

참여연구원 : 한 대 석

참여연구원 : 이 영 철

참여연구원 : 차 환 수

참여연구원 : 오 세 옥

참여연구원 : 장 대 자

참여연구원 : 이 란 숙

협동연구기관 : KT&G

연구책임자 : 나 기 정

참여연구원 : 송 용 범

참여연구원 : 김 미 숙

요 약 문

I. 체 목

우리나라 녹차와 타국산 녹차의 차별화를 위한 특성비교 및 기능성 제품의 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

- 녹차는 차나무과에 속하는 다년생 상록식물로 삼국시대부터 음용하여 왔으며 소독이 차지하는 지수도 타작물에 비해 2~5배 정도 높음
- 그러나 수입 개방화에 따라 2005년도에 녹차시장이 개방되면 중국, 일본, 베트남 등지에서 값싼 녹차가 무차별 수입되어 국내 녹차시장은 큰 타격이 예상됨
- 중국, 일본 등 외국녹차의 수입개방에 대처할 대응논리로 우리녹차의 우수성을 탐색하여 수입산 녹차와의 차별성을 부각시키고 녹차의 생리활성 효과를 이용한 여러 가지 기능성 식품 개발로 녹차 신규 수요 창출 및 부가가치 제고가 필요함

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 국내산 녹차의 채엽시기, 채엽장소 및 가공방법별 녹차성분 분석
2. 국내산 녹차와 일본산 녹차의 생리활성 비교
3. 카테킨의 분리 및 정제
4. 알콜해독 및 간기능 보호 효능 연구(*in vivo*)
5. 녹차와 시너지 효과가 있는 생약재 탐색
6. 녹차기능성 성분이용 기능성 제품 및 숙취해소음료 개발

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 국내산 녹차의 채엽시기별 녹차성분 분석

국내산 녹차의 채엽시기별 녹차성분 분석 결과는 총카테킨은 4월차 40.61 mg/g, 5월차 46.33 mg/g, 6월차 51.56 mg/g 및 7월차에 52.04 mg/g이 함유되어 있었으며, 카페인은 4월차 17.56 mg/g, 5월차 15.71 mg/g, 6월차 14.92 mg/g 및 7월차에 14.61 mg/g이 함유되어 있었다. 유리 아미노산은 4월차 45.85 mg/g, 5월차 22.65 mg/g, 6월차 12.44 mg/g 및 7월차에 10.43 mg/g이 함유되었고, 무기질 중 가장 많이 함유되어 있는 Mg은 4월차 1,283 mg/kg, 5월차 1,362 mg/kg, 6월차 1,528 mg/kg 및 7월차에 1,620 mg/kg이 함유되어 있었다.

2. 국내산 녹차의 산지별 녹차성분 분석

국내산 녹차의 산지별 녹차성분 분석 결과는 4월차 기준으로 총 카테킨은 경남 하동 33.01 mg/g, 전남 보성 36.61 mg/g 및 광주 무등산 34.07 mg/g이 함유되어 있었으며 카페인은 경남 하동 20.34 mg/g, 전남 보성 18.56 mg/g 및 광주 무등산 19.40 mg/g이 함유되어 있었다. 유리 아미노산은 경남 하동 41.60 mg/g, 전남 보성 42.85 mg/g 및 광주 무등산 39.55 mg/g이 함유되었고, 무기질 중 Fe, Mn, Mg, Cu, Na을 분석한 결과 Mg가 가장 많이 함유되어 있었으며 각각의 함량은 경남 하동 1291 mg/kg, 전남 보성 1283 mg/kg 및 광주 무등산 712 mg/kg이 함유 되어 있었다.

3. 국내산 녹차의 가공방법별 녹차 성분 분석

국내산 녹차의 가공방법별 녹차성분 분석을 위해 전남 보성산 5월 차를 가지고 덩음차 및 증제차를 제조하여 실험한 결과 총카테킨은 덩음차 45.26 mg/g, 증제차 47.26 mg/g, 카페인은 덩음차 15.98 mg/g, 증제차 17.41 mg/g이 함유되어 증제차에서 카테킨 및 카페인 함량이 높게 나타났다. 유리 아미노산은 덩음차에 23.84 mg/g, 증제차에 24.0 mg/g이 함유되어 비슷한 경향을 보였다.

4. 국내산 녹차와 일본산 녹차의 녹차성분 비교

국내산 녹차와 일본산 녹차의 성분분석 결과 총카테킨은 국내산 녹차 38.61 mg/g, 일본산 녹차 34.91 mg/g이 함유되어 있었으며 카페인은 국내산 녹차 17.56 mg/g, 일본산 녹차 19.69 mg/g이 함유되어 있었다. 유리 아미노산은 국내산 녹차에 44.85 mg/g, 일본산 녹차에 33.78 mg/g이 함유되어 있었다.

5. 국내산 녹차와 일본산 녹차의 기능성 비교

국내산 녹차와 일본산 녹차의 기능성 비교를 위해 전자공여도, 과산화물가, Angiotensin 변환효소 저해작용 및 항충치 활성을 측정한 결과 전자공여도는 일정농도로 반응시킬 경우 조카테킨 및 EGCg가 BHT에 비해 우수한 것으로 나타났으며, 국내산 및 일본산간에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 과산화물가는 각각 200 ppm 수준으로 첨가하여 측정한 결과 BHT 24.02 meq/kg, 국내산 15.81 meq/kg 및 일본산 14.82 meq/kg으로 국내산과 일본산간에는 큰 차이가 없었으며 BHT보다 우수한 것으로 나타났다. 국내산 녹차와 일본산 녹차의

추출물별 ACE 저해작용을 측정한 결과 각각의 EtOH 추출분말이 조카테킨 보다 2배정도 더 높은 ACE 저해능을 보였으며 국내산과 일본산과의 차이는 별로 없는 것으로 나타났다. 충치균 *Streptococcus mutans*에 대한 최소 생육저해농도(MIC)는 EtOH 추출분말보다 조카테킨에서 항충치균에 대한 효과가 좋았으며 국내산 녹차와 일본산 녹차와의 차이는 거의 없었다.

6. 카테킨의 분리 및 정제

카테킨의 최적 추출조건을 확립하기 위한 용매 선정 및 선정된 용매의 최적 추출농도 실험결과 40~60%의 에탄올로 추출하는 것이 카테킨 추출에 가장 효과적인 것으로 나타났으며, 카테킨 분리를 위해 methylene chloride 및 ethyl acetate를 사용하여 분리, 정제하는 것이 카페인은 대부분 제거하면서 생리활성이 우수한 EGCg가 가장 많이 함유된 카테킨을 얻는 방법으로 가장 효과적이었다.

7. 알콜해독 및 간기능 보호 효능 연구(*in vivo*)

녹차의 용매분획물별 효능 검정 결과, 물추출물 분획이 알콜추출물 분획보다 알콜해독 및 간 TG 축적억제 효능이 우수하게 나타났으며, 녹차 물추출물 용량의존별로 알콜유발 sleep 유도시간이 유의적으로 연장되었고, sleep 시간이 유의적으로 감소되었다. 녹차 물추출물 200mg/kg 이상의 용량에서 혈중 알콜농도가 유의적으로 낮아졌으며, 알콜 투여 24시간 후 고혈당이 유의적으로 개선되었으나, 혈중 TG가 알콜대조군 대비 100% 증가하였다. 산지별 녹차의 효능 검정에서 보성산 녹차의 혈중 알콜농도 감소 및 혈중 중성지방 축적 억제효과가 일본 녹차에 비해 우수한 것으로 평가되었다.

8. 녹차와 시너지 효과가 있는 생약재 탐색

녹차 물추출물 고용량 400mg/kg에서 혈중 알콜농도 저하 효과 및 righting reflex(sleep 유도 및 지속) 효과가 타 생약재에 비해 좋은 것으로 나타났다. 녹차와 시너지 효과가 있는 생약재로 sleep 유도 시간 지연 및 sleep time 단축에 효과적인 오미자, 갈근, 영지, 알콜성 중성지방 축적 억제 효과적인 홍삼, 갈근, 초석잠, 사료 및 물섭취 증가 효과에 효과적인 유자, 복분자, 갈근을 선정하였다.

9. 녹차기능성 성분이용 제품 및 숙취해소음료 개발

녹차기능성 성분이용 숙취해소용 정제 제조를 위해 녹차추출 분말, 실크렙타이드, 홍삼 추출물, 말톨, 비타민류 및 셀룰로스 유도체를 혼합하여 제조하였으며, 경질 캡셀 제조를 위해 녹차 추출분말, 키토올리고당 분말, 갈근 추출분말 및 결명자 추출분말 등을 이용하여 제조하였다. 숙취해소용 음료는 녹차 추출분말과 숙취해소에 뛰어난 효능을 갖는 갈근, 초석잠, 홍삼, 복분자, 영지, 오미자, 비타민류 등을 이용하여 제조하였다.

SUMMARY

I. Title

Chemical and physiochemical properties of Korean green tea and development of functional foods from its active components

II. Purpose and Significance of the Study

- Green tea, a evergreen laurel plant of perennial which belongs to the family of Theaceae, has been used for a drink since Three Kingdom's era, and its income index is 2~5 times higher than other crops

- But, if domestic green tea market is opened by 2005, it is so clear that much cheaper ones indiscriminately imported from China, Japan, Vietnam, etc. would give tremendous damage to domestic green tea market

- To deal with this opening of domestic green tea market wisely, we need to emboss the superiority of Korean green tea with active research and advertisement to public and to create new demand and increase of added value by developing various functional foods using biological effects of Korean green tea

III. Scope and Content of the Study

1. Chemical compounds analysis according to plucking time, plucking places and processing method of Korean green tea
2. Comparison of biological activity of Korean and Japanese green tea
3. Separation and purification of catechins
4. Research on alcohol detoxification and liver function protection effects (*in vivo*)
5. Search for nature remedies which have synergy effects with green tea
6. Development of functional products and solving-hangover-problem drinks utilizing functional components of green tea

IV. Results and Recommendation

1. Analysis of chemical compounds of Korean green tea according to the plucking time

According to the results of chemical compounds analysis, 40.61 mg/g of catechins was found in plucked tea in April, 46.33 mg/g in plucked tea in May, 51.56 mg/g in plucked tea in June, 52.04 mg/g in plucked tea in July. And 17.56 mg/g of caffeine were found in plucked tea in April, 15.71 mg/g in plucked tea in May, 14.92 mg/g in plucked tea in June, 14.61 mg/g in plucked tea in July. Free amino acid contained in plucked tea in April was 45.84 mg/g, in plucked tea in May 22.64 mg/g, in plucked tea in June 12.22 mg/g, in plucked tea in July 10.45 mg/g. And Mg, the most among minerals, was 1283 mg/g in plucked tea in April, 1362 mg/g in plucked tea in May, 1528 mg/g in plucked tea in June, 1620 mg/g in plucked tea in July.

2. Analysis of chemical compounds of Korean green tea according to the plucking places

The result of chemical compounds analysis according to the plucking places based on plucked tea in May shows that catechins of Kyounghnam Hadong was 33.01 mg/g, of Chonnam Posong 33.61 mg/g, of Kwangju Mudungsan 34.07 mg/g, and caffeine of Kyounghnam Hadong was 20.34 mg/g, of Chonnam Posong 15.86 mg/g, of Kwangju Mudungsan 39.55 mg/g. And the analysis result of Fe, Mn, Mg, Cu, Na among minerals shows that Mg was the most and of Kyounghnam Hadong contained 1,291 mg/kg, of Chonnam Posong 1,283 mg/kg, of Kwangju Mudungsan 712 mg/kg.

3. Analysis of chemical compounds of Korean green tea according to the processing methods

For this analysis, we produced roasted green tea and steamed green tea with plucked tea in May of Chonnam Posong. As results, catechins in roasted green tea was 45.26 mg/g, in steamed green tea 47.26 mg/g, and caffeine in roasted green tea was 15.98 mg/g, steamed green tea 17.41 mg/g, so both catechins and caffeine were appeared to be more in steamed green tea. Free amino acids also showed similar results as was contained 23.84 mg/g in roasted green tea, and 24.0 mg/g in steamed green tea.

4. Comparison of chemical compounds of Korean and Japanese green tea

Analysis result shows that Korean contains more catechin, free amino acids and less caffeine than Japanese(catechins; Korean 38.62 mg/g, Japanese 34.91 mg/g. free amino acids; Korean 44.85 mg/g, Japanese 33.78 mg/g. caffeine; Korean 17.56 mg/g, Japanese 19.69 mg/g).

5. Comparison of functional properties of Korean and Japanese green tea

To compare functional properties of Korean green tea with those of Japanese, we measured electron donating ability, POV, inhibitory activity of Angiotensin converting enzyme and anticaries activity. The result shows that crude catechins and EGCg are superior to BHT when electron donating ability are responded with the same concentration and no significant difference was appeared between Korean and Japanese.

And the result of measuring POV each 200 ppm level tested, shows that BHT 24.02 meq/kg, Korean 15.81 meq/kg, Japanese 14.82 meq/kg. Thus, it appears that there is no big difference between Korean and Japanese and appears to be superior to BHT. The result of measuring ACE inhibitory activity shows that each EtOH-fraction has twice higher activity than crude catechins, and there appeared no significant difference between Korean and Japanese.

Minimum inhibition concentration to *Streptococcus mutans* has better effect to anticaries activity in crude catechins than EtOH-fraction, no significant difference appeared between Korean green tea and that of Japanese.

6. Separation and purification of catechins

The results of experiments for the selection of solvent to establish the best extraction condition of catechins and for the best fitting extraction density of the selected solvent show that they are best to extract catechins from 40-60% ethanol, and to separate and refine it with methylene chloride and ethyl acetate as they enable you to have catechins most effectively with no caffeine and plenty of physioactive EGCg.

7. Research on alcohol detoxification and liver function protective effects (*in vivo*)

The result of effectiveness verification of green tea according to fractionation shows that water-fraction is much more effective in alcohol detoxification and liver TG accumulation than that of alcohol-fraction, and the induction time of sleep after alcohol administration has been noticeably delayed and sleep-time also has been noticeably reduced. After administration of water-fraction (200 mg/kg) blood alcohol concentration of those showed noticeable decrease and blood glucose level also improved after 24 hours of alcohol dose, but TG in blood increased 100 % when compared to alcohol control. The result of verification of effectiveness according to origin of agriculture confirms that the effectiveness of domestic green tea (Bosung) to decrease blood alcohol concentration and suppress serum TG level surpasses Japanese green tea.

8. Search of nature medicine which has synergy effects with green tea

Green tea water extract (400 mg/kg) has prominent effect on decrease in blood alcohol concentration and righting reflex (inducement and continuation of sleep). The nature medicines which have following effect and are edible also, are selected; time delay effect of sleep inducement and time reducing effect of sleep (Schizandrae Fructus, Puerariae Radix, Ganodermae Lignum), suppression effect of alcoholic neutral fat accumulation (Red ginseng, Puerariae Radix, Chinese artichoke), increase effect of taking more food and water (Citri Junoris Fructus, Rubi Fructus, Puerariae Radix).

9. Development of functional products and solving-hangover-problem drinks utilizing functional components of green tea

For these purposes, after many and varied experiments, we could make three kinds of product for hangover problem; the first one is a tablet with green tea extract, silk-peptide, maltol, vitamins and capsule with green tea extracts powder, chito-oligo powder, Puerariae Radix extract, and the third one is a drink with green tea, Puerariae Radix, Chinese artichoke, Red ginseng, Rubi Fructus, Ganodermae Lignum, Schizandrae Fructus and vitamins.

여 백

CONTENTS

Summary in Korean	1
Summary in English	7
Chapter 1. Introduction	23
Chapter 2. Trends of research	29
Chapter 3. Methods and Results	31
Part 1. Functional and physiological activities of green tea	31
A. Introduction	31
B. Materials and Methods	33
1. Analysis of chemical compounds of green tea	33
2. Analysis of functional properties of green tea	35
C. Results and Discussion	38
1. Analysis of chemical compounds in Korean green tea at different plucking time	38
2. Analysis of chemical compounds in Korean green tea at different plucking places	43
3. Comparison of chemical compounds of Korean green tea at different processing method	48
4. Comparison of chemical compounds of Korean and Japanese green tea	51
5. Comparison of functional properties of Korean and Japanese green tea	54
Part 2. Development of solving-hangover-problem drinks utilizing functional components of green tea	63

A. Introduction	63
B. Materials and Methods	65
1. Animal	65
2. Protocols for evaluating herb medicine efficacy	65
3. Preparation of herb extract	65
4. Preparation of mixture of green tea and herbs	66
5. Determination of serum and hepatic lipid content	66
6. Determination of blood alcohol concentration	66
7. Analysis of index of hepatic toxicity	66
C. Results and Discussion	67
1. Studies on alcohol detoxification and liver function protective effects of green tea (<i>in vivo</i>)	67
2. Synergy effects of herb medicine	74
3. Effects of green tea mixrute	76
Part 3. Development of tea products from functional components of green tea	81
A. Introduction	81
B. Materials and Methods	82
1. Optimization of extraction condition of catechins	82
2. Optimization of purification condition of catechins	83
3. Development of tea products from functional components of green tea	83
C. Results and Discussion	83
1. Optimization of extraction condition of catechins	83
2. Content of catechins by various purifying method	85

3. Study of recovery rate of catechins and caffeine	91
4. Manufacture of solving-hangover-probkem drinks	93
5. Development of tablet products from chemical compounds of green tea	99
6. Development of capsule products from chemical compounds of green tea	103
Chapter 4. Attainments of research goal	107
Chapter 5. Application plans of research results	109
Chapter 6. Science and Technology information of foreign countries	111
Chapter 7. Reference	113

여 백

목 차

요 약 문	1
SUMMARY	7
제1장 연구개발과제의 개요	23
제1절 연구의 필요성	23
제2절 연구의 목적 및 범위	26
제2장 국내외 기술개발 현황	29
제3장 연구개발수행 내용 및 결과	31
Part 1. 녹차의 기능성성분 및 생리활성 연구	31
제1절 서설	31
제2절 재료 및 방법	33
1. 녹차의 주요성분 분석	33
가. Catechins 및 Caffeine 분석	33
나. 유리아미노산 분석	34
다. 무기질 분석	35
2. 녹차의 기능성 분석	35
가. 녹차시료 조제	35
나. 전자공여도	36
다. 과산화물가	36
라. Angiotensin 변환효소(ACE) 저해작용	37
마. 항충치 활성	37
제3절 결과 및 고찰	38
1. 국내산 녹차의 채엽시기별 녹차성분 분석	38
가. 카테킨 함량 변화	38
나. 카페인 함량 변화	40

다. 유리아미노산 함량 변화	40
라. 무기질 함량 변화	43
2. 국내산 녹차의 산지별 녹차성분 분석	43
가. 카테킨 함량	43
나. 카페인 함량	45
다. 유리아미노산 함량	45
라. 무기질 함량	47
3. 국내산 녹차의 가공방법에 따른 녹차성분 비교	48
가. 제조공정	48
나. 카테킨 함량	49
다. 카페인 함량	49
라. 유리 아미노산 함량	49
4. 국내산 녹차와 일본산 녹차의 주요 녹차성분 비교	51
가. 카테킨 함량	51
나. 카페인 함량	52
다. 유리아미노산 함량	52
라. 무기질 함량	54
5. 국내산 녹차와 일본산 녹차의 기능성 성분 비교	54
가. 시료의 카테킨 및 카페인 조성	54
가. 전자공여도	56
나. 과산화물가(POV)	58
다. Angiotensin 변환효소(ACE) 저해작용	60
라. 항충치 효과	61

Part 2. 녹차를 이용한 숙취해소제의 개발	63
제1절 서설	63
제2절 재료 및 방법	65
1. 실험 동물	65
2. 녹차 및 생약재의 효능검정 Protocol	65
3. 연구용 시료의 제조	65
4. 녹차생약복방제 시제품 제조	66
5. 혈청 및 간내의 lipid content 측정	66
6. 혈중 알콜농도 측정	66
7. 혈청의 간 손상지표 측정	66
제3절 결과 및 고찰	67
1. 녹차추출물의 알콜해독 및 간 기능보호 효능 연구 (in vivo)	67
가. 녹차의 효능 검정	67
나. 녹차 물 추출물의 용량별 효능검정	69
다. 국내산 녹차와 일본산 녹차의 효능비교	72
2. 녹차와 시너지 효과를 갖는 생약재 탐색	74
3. 녹차생약복방제의 효능	76
Part 3. 녹차의 기능성 성분을 이용한 제품개발	81
제1절 서설	81
제2절 재료 및 방법	82
1. 카테킨의 최적 추출조건 선정	82
2. 카테킨의 최적 정제조건 선정	83
3. 녹차기능성 성분을 이용한 제품개발	83
가. 가용성 고형분 함량	83

나. pH 측정	83
다. 기호도 조사	83
제3절 결과 및 고찰	83
1. 카테킨의 최적 추출조건 선정	83
2. 카테킨 정제방법에 따른 카테킨 함량	85
3. 표준품을 사용한 카페인 및 카테킨 회수율 조사	91
4. 숙취해소 음료 제조	93
가. 생약류의 최적 추출조건 확립	93
나. 녹차와 생약재를 이용한 숙취해소 음료 제조	93
5. 녹차성분 이용 정제(Tablet) 제조	99
가. 정제제품의 배합비	99
나. 정제제품의 제조공정도	101
6. 녹차성분 이용 캡셀 제조	103
가. 캡셀의 원료	103
나. 캡셀제제의 검토	103
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	107
제5장 연구개발결과의 활용계획	109
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	111
제7장 참고문헌	111

제1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구의 필요성

1. 기술적 측면

- 우리나라 전체의 녹차 재배면적은 667 ha, 생산량은 835 M/T 이며 (1995년 기준) 전남 보성, 강진, 해남, 광양, 영암, 경남하동, 산청, 제주도 등 남해안 일원에서 재배되고 있음
- 현재는 녹차 소득이 차지하는 지수가 타작물에 비해 2~3배 정도 높아 식부면적 및 생산량이 계속적으로 증대되고 있음
- 녹차에는 현재 관세가 현미녹차는 40%, 잎녹차는 534% 부과되고 있으며 2001년 부터는 잎녹차의 관세가 300%로 내릴 예정이며 그후 2004년에 완전히 개방예정으로 중국, 일본, 베트남 등지에서 값싼 녹차가 물밀 듯이 들어와 우리녹차 산업은 뿌리째 흔들릴 것이 분명함
- 녹차는 5천년의 오랜 역사를 거치면서 경험적으로 알려진 여러 가지 질병치료 효과 때문에 귀한 약으로 사용되었고 점차 재배 및 제조 기술이 발전됨에 따라 건강 보건성 음료로 정착되고 있음
- 차에는 카테킨, 카페인, 단백질, 아미노산, 섬유소, 펙틴 등과 엽록소, 플라보놀 유도체, 안토시안 등의 식물색소 그리고 지질, 수지류, 정유, 비타민, 무기질 등이 함유되어 이들 화학성분들에 의해 여러 가지 약리효과를 갖는 것으로 보고되고 있음
- 중국, 일본 등 외국녹차의 수입개방에 대처할 대응논리로 녹차의 기능성

성분을 산지별, 가공방법별 또는 채엽시기별로 생리활성 성분을 분석 비교하여 국외산 녹차와 국내산 녹차의 차별화성을 적극 부각하여 수입개방에 대비하는 것이 필요함

- 녹차의 중요한 기능성 성분으로 알려진 카테킨의 분리, 정제 기술개발을 통한 다양한 식품소재 및 특수영양식품으로 활용함으로써 녹차의 활용도 제고가 필요함
- 녹차는 함유된 polyphenol 등 여러 가지 성분에 의한 여러 가지 효능이 보고되고 있는데 녹차의 기능성 성분을 이용하여 새로운 숙취 해소제 개발은 상품성이 클 것으로 사료됨

2. 경제·산업적 측면

- 현재 국내에서는 연간 약 건엽기준으로 900 여톤 정도의 녹차가 소비되고 있으며 일부 티백 녹차를 제외하고는 거의 국내산 녹차가 이용되고 있음
- 그러나 티백용 현미녹차는 매년 중국 등지에서 수입(관세 40%)이 계속적으로 증가하고 있으며 또한 수입된 녹차 일부가 덤핑 판매되고 있어 현재 국내 티백 녹차 시장은 상당히 문란함 상태임
- 2005년도에 녹차시장이 전면 개방되면 중국, 일본, 베트남 등지에서 값싼 녹차가 무차별 수입되어 국내 녹차시장은 큰 타격이 예상됨
- 녹차의 수입개방시 최대의 수입예상지인 중국의 경우 절강, 호남,

안휘, 운남, 복건성 등 19개 성에서 차를 재배하고 있으며 생산량이 60 여만톤으로 우리나라 생산량의 약 700배에 이르고 있음

- 일본의 경우도 静岡, 京都 등지에서 1995년 기준 약 85,000 여톤이 생산되고 있으며 베트남 등지도 값싼 노동력을 이용하여 녹차생산량을 계속적으로 늘려가고 있는 실정임
- 따라서 녹차의 전면 수입개방에 대비하여 우리녹차의 우수성을 홍보할 수 있는 기능성 인자의 탐색 및 녹차가 가진 생리활성에 초점을 맞춘 고부가가치 기능성 식품 개발은 필수적임
- 아울러 녹차를 주체로 한 숙취해소제 등을 개발하여 국내 수요는 물론 수출상품화에도 주력하여 녹차의 활용도를 제고하여야 할 것임

3. 사회·문화적 측면

- 수입개방의 가속화로 농가 주요작물의 하나인 녹차가 폐농이 되면 녹차농가들의 상품화 및 녹색공간 확보에 심각한 타격이 예상됨
- 우리녹차의 우수성을 탐색하여 수입산 녹차와의 차별성을 부각시키고 녹차의 생리활성 효과를 이용한 여러 가지 제품개발로 녹차 신규수요 창출 및 부가가치 제고로 농민의 안정적 생산기반 확보가 필요함
- 삼국시대부터 음용하여 우리민족과 함께 하여온 녹차문화를 지속적으로 발전시켜 민족의 자긍심을 제고하고 국민건강적 측면에서는 녹차에 함유되어 있는 여러가지 건강 기능적인 면을 적극 홍보하여 국민들이 녹차를 적극 이용할 수 있도록 함

제2절 연구의 목적 및 범위

1. 연구의 목표

본 연구의 목적은 중국, 일본 등 외국녹차의 수입개방에 대처할 대응 논리로 녹차를 산지별, 가공방법별 및 채엽시기별로 생리활성 성분을 분석 비교하여 국외산 녹차와 국내산 녹차의 차별화성을 적극 부각함과 동시에 녹차의 기능성 성분을 이용한 여러 가지 제품개발로 녹차 신규수요 창출 및 부가가치 제고로 농민의 안정적 생산기반을 확보하는데 있다.

2. 연구의 내용 및 범위

가. 녹차의 기능성성분 및 생리활성 연구

녹차의 유효성분이 많이 산출되는 장소 및 시점을 결정하여 녹차의 활용도에 따른 녹차 생산시 이용하기 위하여 녹차의 채엽시기, 채엽장소 및 가공방법별 녹차성분 즉, 카데킨, 카페인, 아미노산 및 무기질 등의 함량을 비교하였으며 또한 우리 녹차가 갖는 유효활성 성분의 특성을 일본산 녹차와 비교하였다

나. 녹차를 이용한 숙취해소제의 개발

녹차 및 생약재를 중심으로 혈중 알콜농도 저하 효과, 알콜에 의한 물질대사 교란 억제 효과 및 알콜유발 간 TG 억제 효능을 주요 지표로 사용하여 신소재를 탐색하였으며, 알콜성 간질환의 초기 증상인 지방간에 초점을 맞추어, 동물실험 및 임상실험에 적용 가능한 모델을 설정하여, 급성 알콜성 질환에 대한 녹차생약복방제의 예방 효과를 검정하고, 제품화에 연계 및 녹차 주재의 고부가가치 기능성 제품을 개발하였다.

다. 녹차의 기능성 성분을 이용한 제품개발

카테킨의 최적 추출조건 및 정제조건을 확립하고, EGCg 고함유 카테킨 및 무카페인 카테킨 제조를 위한 정제방법 확립 및 이들 조카테킨을 이용한 여러 가지 카테킨 함유 가공제품을 개발하였다.

여 백

제2장 국내외 기술개발 현황

- 우리나라에서 재배되고 있는 녹차의 주 품종은 재래종과 야부끼다이며 이들 국내산 녹차 국외산 녹차의 기능성 성분 및 생리활성 효능에 대한 비교평가에 관한 보고는 아직 없음
- 녹차의 성분에 관한 연구는 국·내외 여러 문헌에 다수 보고되고 있으나 대부분이 임의의 시료를 택해 분석한 것으로 산지별, 채엽 시기별, 가공방법 등에 따라 체계적으로 비교 분석되지 않았음
- 녹차의 유효성분인 카테킨은 주로 에피갈로카테킨 갈레이트, 에피카테킨 갈레이트, 에피갈로카테킨, 에피카테킨으로 구성되는데 이들 성분은 항충치, 항균, 항산화, 소취작용 및 혈당치, 혈중 콜레스테롤 상승억제, 항종양, 과산화지질 생성 억제작용 등 다양한 생체조절 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있어, 식품가공이나 수산가공, 화장품 등의 첨가제로 이용영역이 확대되고 있으나 국내에서는 경제성이 있는 형태의 카테킨류 추출, 정제기술은 없는 실정임
- 녹차에서의 숙취해소에 관련한 연구는 대부분이 효능에 대한 연구가 부분적으로 진행되고 있을 뿐으로 녹차 성분을 이용한 숙취 해소에 관련된 제품은 없는 실정임

여 백

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

Part. 1 녹차의 기능성성분 및 생리활성

제1절 서설

차는 오랜 역사를 거치면서 각 민족이 그 기호와 기술에 맞게 여러 가지 다양한 차가 고안되어 현재에 이르고 있다. 차는 다수의 품종, 산지, 계절, 제법, 형상, 풍미 등에 따라 수많은 이름이 존재하며 차의 분류도 확정되어 있지 않은 상태이다. 통상 발효정도에 기준을 둔 분류법이 많이 통용되고 있다. 발효정도 즉, polyphenol oxidase에 의한 산화정도에 따라 발효도가 0%인 불발효차(녹차), 20~60%인 반발효차(백차, 화차, 포종차, 우롱차 등) 및 80% 이상인 발효차 (홍차)로 분류된다. 이 중 녹차는 차잎을 채취 즉시 차잎에 존재하는 산화효소를 불활성화 시켜 발효를 정지시키는 방법에 따라 가마솥에 덪어서 만드는 덪음(釜炒)차와 수증기로 찌서 만드는 증제(蒸製)차가 있다.

차의 품질은 차엽의 채엽시기, 성숙도, 품종 및 토양, 기상, 시비 등 주위환경에 따라 크게 영향을 받으며 이같은 외부조건에 의해 차의 화학 성분들이 변화하여 차의 풍미가 달라진다. 녹차의 맛은 떫은맛, 쓴맛, 감칠맛과 미세한 단맛이 조화를 이루어 나타난다. 떫은맛과 쓴맛은 카테킨 및 카페인에 의한 것이며 감칠맛은 주로 아미노산에 기인한다. Free catechin들은 후미에 단맛을 부여한다. 차에 함유되어 있는 주성분은 카테킨류, 카페인, 아미노산류, 비타민 C, 비타민 E, β -카로틴, 불소, 아연 등 미네랄류가 있고 각각의 성분이 각종의 생리기능을 가지고 있다.

이들 성분에 대하여는 오래전부터 연구가 진행되어와 카페인의 각성 작용, 강심작용, 이뇨작용, 불소의 충치예방작용 등이 예로부터 알려져 있었다. 최근 활발히 연구되고 있는 성분은 카테킨류로 항산화, 항암, 항돌

연변이, 혈압상승억제, 항바이러스, 충치예방 등 각종의 생리기능을 가지는 것에서 항산화, 소취작용, 충치예방 등의 기능을 가지는 식품소재로서 실용화되어 가공식품분야에 널리 이용되고 있다. 카테킨류는 수용성이지만 차잎에는 비타민 E나 β -카로틴 등의 지용성 성분도 함유되어 이들 성분들은 생체내에서 면역반응이나 암발생에 악영향을 주는 활성산소나 활성산소 유래의 산물을 제거하는 과정에 관여한다고 알려져 있으며 동시에 항산화 작용을 하는 카테킨과 같이 섭취하면 상승효과를 기대할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 녹차의 유효성분이 많이 산출되는 장소 및 시점을 결정하여 녹차의 활용도에 따른 녹차 생산시 이용하기 위하여 녹차의 채엽시기, 채엽장소 및 가공방법별 녹차성분 즉, 카테킨, 카페인, 아미노산 및 무기질 등의 함량을 비교하였으며 또한 우리 녹차가 갖는 유효활성 성분의 특성을 일본산 녹차와 비교하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 녹차의 주요성분 분석

가. Catechins 및 caffeine 분석

녹차 중에 존재하는 카테킨류 및 카페인을 분석하기 위하여 녹차침출액을 0.45 μm membrane filter로 여과하여 분석용액으로 사용하였다. 이때 카테킨 및 카페인 분석은 JASCO(JASCO Co., Japan) HPLC pump(Model PU-980), column oven (Model CO-965), autoinjector(Model AS-950-10) 및 UV/VIS detector(Model UV-975)로 구성된 HPLC를 이용하여 SentiTM μ Bondapak C18 guard column(125Å, 3.9×20 mm, Waters, USA)을 장착한 μ Bondapak C18 column(125Å, 3.9×300 mm, Waters, USA)으로 207 nm에서 검출하였으며, Table 1의 조건으로 분석하였다.

Table 1. Condition of mobile phase for HPLC analysis of green tea

Mobile phase A : H₂O-CH₃CN-85% H₃PO₄ (94.95 : 5 : 0.05, v/v/v)

B : H₂O-CH₃CN-85% H₃PO₄ (49.95 : 50 : 0.05, v/v/v)

Gradient table	Time	Flow(mL/min)	%A	%B
	0	1.0	90	10
	5	1.0	90	10
	10	1.0	70	30
	20	1.0	20	80

나. 유리아미노산 분석

차의 분석법에 따라 시료 용액에 PVPP를 가해 진탕하고, 30 분간 정치 후 여과하였다. 이 여액 1 mL를 vial에 넣고 진공건조 후 phenyliso-thiocyanate로 유도체화 하여 완전 건조 후 이동상 A 용액 200 μ L에 녹여 0.45 μ m membrane filter를 통과시킨 후 Table 2의 조건에 따라 분석하였다. 이때 각 아미노산의 정량은 시료의 HPLC chromatogram의 peak area를 병행 실험된 표준물질의 peak area에 기준하여 산출하였다.

Table 2. HPLC Conditions for free amino acid analysis

Instrument	Waters PicoTag system
Column	Picotag 8.5 \times 300 mm
Pump	Waters 510
Injector	Waters 712 WISP
Detector	Photodiode array detector Waters 990 at 254 nm
Solvent	A) 1.4 mM NaHAc, 0.1% TEA, 6% CH ₃ CN, pH 6.1 B) 60% CH ₃ CN
Elution	Linear gradient of solvent B (0~100%)
Flow rate	1.0 mL/min

다. 무기질 분석

녹차엽의 무기질은 고주파 플라즈마법(Inductively Coupled Plasma, Jobin Yvon Co., France)으로 정량하였다. 녹차를 pyrex beaker에 넣고 HNO₃와 H₂O₂로 산 분해시킨 후 산을 충분히 날린 뒤 약 1~5% 정도의 HNO₃ 농도로 만들어 분석하였다. 무기질 분석을 위한 ICP-AES의 조건은 Table 3에 나타냈다.

Table 3. Operating condition for mineral analysis of green tea by ICP

Instrument	Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, Jobin Yvon Co., France
Source	Argon plasma (6000K)
Resolution	0.005nm (UV)
Wavelength(nm)	Fe 238.204 Mn 257.610 Mg 279.553 Cu 324.754 Na 589.592

2. 녹차의 기능성 분석

가. 녹차시료 조제

국내산 녹차는 보성녹차 우전(4월산) 350 g을 50% EtOH 3,500 mL을 가해 실온에서 2시간 추출하여 여과하였다. 여과액은 50℃에서 감압 농축하여 1300 mL를 얻었다. 이것을 녹차함량 기준 100 g 상당량(농축액 기준 371.4 mL)과 250 g 상당량(농축액 기준 928.6 mL)으로 분주하여

녹차함량 100 g 상당량은 동결건조 할 수 있을 만큼 농축하여 동결건조 (EtOH powder)하였으며 녹차함량 250 g 상당량은 methylene chloride와 ethyl acetate를 사용하여 crude catechin을 얻은 후 농축하여 동결건조 하였다. 일본산 녹차는 옥로(4월산)를 사용하여 국내산 녹차와 똑같은 방법으로 실시하였다.

나. 전자공여도

전자공여도(electron donating ability)는 각 화합물의 DPPH에 대한 전자공여 효과로 시료의 환원력을 측정하였다. 즉, 각 농도별로 용해된 국내산 및 일본산 녹차의 조카테킨, 표준품 BHT 및 EGCg 0.2 mL에 2×10^{-4} M DPPH 용액 0.8 mL를 가한 후 vortex mixer로 10초간 진탕하고 실온에서 10분 방치 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였고 전자공여 효과는 시료 첨가구와 첨가하지 않은 경우의 흡광도를 백분율로 나타내었다.

다. 과산화물가

과산화물가란 유지 1 kg에 의하여 요오드 칼륨에서 유리되는 요오드의 밀리당량수로서 대두유를 사용하여 국내산 및 일본산 녹차의 조카테킨, 표준품 EGCg 및 BHT를 각각 200 ppm 수준으로 첨가하여 50°C incubator에 저장하면서 식품공전의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 각각의 시료 2~5 g씩을 250 mL 삼각 플라스크에 취한 후 acetic acid: chloroform(3:2, v/v) 용액 25 mL로 용해하고 사용직전에 조제된 포화 potassium iodide(KI) 1mL를 가하여 30초간 흔든 뒤 암소에서 10분간 방치하였다. 그런 다음 30 mL의 증류수를 가하여 세게 흔든 다음 1% 전분용액을 지시약으로 사용하여 0.01N sodium thiosulfate 용액으로 적정하여 과산화물가(meg/kg)를 다음식으로 산출하였으며 따로 공시험을 하여 보정하였다.

과산화물가(meq/kg) = (a-b) × F/시료무게(g) × 10

a = 0.01N sodium thiosulfate 용액으로 적정량(mL)

b = 공시험에서 0.01N sodium thiosulfate 용액으로 적정량(mL)

F = 0.01N sodium thiosulfate 용액의 역가

라. Angiotensin 변환 효소(ACE) 저해작용

ACE 저해작용은 V. Vermeirssen 등의 방법에 따라 측정하였다. 즉 시료 500 μ L에 N-[3-(2-furyl)acryloyl]-L-phenylalanylglycylcine(FAPGG)가 0.5 mmol/L 수준으로 함유되어 있는 ACE reagent(sigma No. 305-10) 500 μ L를 첨가하여 섞은 후 2분간 37 $^{\circ}$ C에서 반응시킨 후 조효소액인 ACE control E(sigma No. A7040) 100 μ L를 첨가하여 5분간 37 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 이때 water를 reference로 하고 340 nm에서 정확히 5분간의 시간 간격을 두고 흡광도를 측정하여 ACE 저해활성을 측정하였다.

마. 항충치 활성

1) 균주

항충치 활성 측정을 위한 균주는 한국식품개발연구원에서 분양 받은 KFRI01171(KCTC3298) *Streptococcus mutans*를 사용하였다.

2) 균주의 배양

*Streptococcus mutans*를 BHI(brain heart infusion Co.)에 접종하여 37 $^{\circ}$ C incubator에서 계대배양 함으로서 활성화시키고, 활성화된 균주는 BHI broth에 1.5% agar를 첨가한 고체배지에 분주하여 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양하여 사용하였다.

3) 균수 측정

계대배양한 균주는 colony 분리를 위해 BHI plate에서 48시간 배양하여 1 colony를 분취 후 50 ml BHI broth에 분주하여 24시간 shaking incubator에서 배양하였다. 그런 다음 10배 순차 희석하여 $10^{-5} \sim 10^{-10}$ 까지 BHI plate에 100 μ L 도말 후 48시간 배양하여 균수(CFU/mL)를 측정하였다. 이때 희석은 균주 0.1 mL에 0.85% 생리식염수 0.9 mL을 혼합하여 사용하였다.

4) 최소저해농도(MIC) 측정

충치균에 대한 녹차 추출물의 최소저해농도(MIC, minimum inhibitory concentration) 측정은 항균실험에서 나타난 균수 측정결과 증식이 나타나지 않은 최저 농도를 MIC로 하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 국내산 녹차의 채엽시기별 녹차성분 분석

국내산 녹차의 채엽시기별 녹차성분 비교를 위해 보성군 소재의 한 다원에서 녹차엽을 시기별로 채취하여 카테킨, 카페인, 유리아미노산 및 무기질을 분석하였다.

가. 카테킨 함량 변화

카테킨류는 항암, 항산화, 항돌연변이 등 다양한 기능성을 갖는 녹차의 중요성분으로 flavonoid, anthocyanin 등의 공통적 구조상의 특징인 C6-C3-C6형 탄소 골격을 갖는 물질이다.

녹차의 채엽시기별 카테킨 조성 분석 결과는 Table 4에 나타난 바와 같다. 녹차엽 중의 카테킨 조성은 채엽시기에 관계없이 EGC, EGCg, EC, GC, ECg, C, GCg 및 Cg의 순으로 함유되어 있었고, 총카테킨 함량은

4월차 40.61mg/g, 5월차 46.33 mg/g, 6월차 51.56 mg/g 및 7월차에 52.04 mg/g으로 채엽시기가 늦을수록 증가하였다. 위 등 및 오 등은 채엽시기 별 카테킨 함량을 분석하여 보고한 바 있는데 이들은 녹차 추출물을 정제하여 crude catechin에 대해 분석하였으며, 또한 EGCg, EGC, EC 및 C 등 4종만을 분석하였다. 그들의 결과에 의하면 채엽시기가 늦을수록 카테킨 함량은 많은 것으로 보고하여 본 연구의 결과와 비슷하였으나 카테킨 조성은 EGCg가 가장 많은 것으로 보고한 바 있어 본 연구와는 상이하게 나타났다. 이러한 결과는 시료의 전처리 방법 등 분석방법의 차이에 의한 것으로 사료된다.

Table 4. Change of catechin contents in green tea leaves at different plucking time

	Contents(mg/g)			
	4	5	6	7
EGC	14.80±0.126	18.84±0.434	21.27±0.152	20.80±0.242
EGCg	8.54±0.054	8.13±0.338	9.37±0.052	8.98±0.043
EC	6.81±0.074	7.38±0.020	7.41±0.147	8.91±0.174
GC	4.07±0.100	5.94±0.156	7.26±0.010	6.74±0.043
ECg	3.25±0.003	2.61±0.083	3.12±0.057	3.08±0.128
C	1.69±0.003	1.69±0.018	2.09±0.001	1.88±0.013
GCg	1.20±0.047	1.49±0.077	1.01±0.007	1.57±0.028
Cg	0.25±0.001	0.25±0.001	0.03±0.005	0.08±0.007
Total catechin	40.61	46.33	51.56	52.04
Caffeine	17.56±0.011	15.71±0.144	14.92±0.049	14.61±0.418

나. 카페인 함량 변화

카페인은 알칼로이드의 일종으로 녹차의 정미성분 중에서 약한 쓴맛을 나타내며 aflatoxin의 생성을 감소시키는 효과, 생체내에서 이노작용을 비롯해 중추신경계의 자극에 의해 운동량 및 학습능력을 증가시키며, 머리를 맑게 하고 알콜에 의한 마비증상을 극복하는 등의 약리작용이 있다고 알려져 있다.

녹차의 채엽시기에 따른 카페인 분석 결과는 Table 4에 나타낸 바와 같이 4월차 17.56mg/g, 5월차 15.71 mg/g, 6월차 14.92 mg/g 및 7월차 14.61 mg/g으로 채엽시기가 늦을수록 카페인 함량은 감소하는 경향을 나타내 카테킨과는 상반된 결과를 나타냈다. 이러한 결과는 오 등의 보고와 일치하였으나 카페인 함량은 17.56 mg/g~14.61 mg/g으로 오 등의 22.3 mg/g~18.5 mg/g과는 상당한 차이가 있었다.

다. 유리 아미노산 함량 변화

아미노산은 차의 독특한 감칠맛을 내는 성분으로 카페인의 쓴맛, 카테킨의 떫은맛과 더불어 차의 맛에 크게 관여하는 물질이다. 테아닌은 다른 식물에서는 찾아볼 수 없는 녹차 정미성분으로 인체에서 α -뇌파 등을 일으키는 것으로 알려져 있다. 양질의 녹차일수록 차 특유의 amide가 다량 함유되어 있고 특히 theanine, glutamic acid, arginine 등 유리 아미노산 총 함량이 아주 중요하다고 한다.

녹차의 채엽시기에 따른 유리 아미노산 함량 변화는 Table 5에 나타낸 바와 같다. 총 아미노산 함량은 4월차 45.85mg/g, 5월차 22.65 mg/g, 6월차 12.44 mg/g 및 7월차 10.43 mg/g으로 채엽시기가 늦을수록 총 아미노산 함량은 급격히 감소되었음을 알 수 있었다. 녹차에 함유된 아미

노산 중 중요한 생리적 기능을 갖는 theanine이 채엽시기가 늦을수록 현저히 감소되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 총 아미노산 함량이 오 등이 보고한 27.81 mg/g~12.91mg/g과는 약간 상이한 결과는 나타냈는데 이는 오 등이 아미노산 조성 중 녹차에 주로 많이 함유되어 있는 theanine을 분석하지 않은데서 기인한 것으로 사료된다.

Table 5. Change of free amino acid contents in green tea leaves at different plucking time

	Contents(mg/g)			
	4	5	6	7
¹ CYA	ND	ND	0.33	0.33
Aspartic acid	1.92	1.02	1.14	0.69
Glutamic acid	2.97	1.78	1.44	0.87
Asparagine	0.33	0.25	0.28	0.21
Serine	0.84	0.60	0.29	0.25
Glutamine	3.73	1.12	0.30	0.24
Glycine	0.07	0.06	0.05	0.04
Histidine	0.47	0.25	0.19	0.15
Arginine	5.91	1.63	0.32	0.21
Threonine	0.18	0.15	0.13	0.11
Alanine	3.54	2.55	3.33	3.64
GABA	0.49	0.32	0.30	0.20
Proline	0.16	0.12	0.15	0.09
Theanine	21.73	9.65	2.19	1.92
Tyrosine	0.15	0.17	0.20	ND
Valine	0.35	0.54	0.46	0.42
Methionine	0.14	0.15	0.10	0.12
Cystine	ND	ND	0.17	0.18
Isoleucine	0.20	0.18	0.24	0.20
Leucine	0.18	0.18	0.31	0.50
Phenylalanine	0.26	0.24	0.27	ND
Tryptophan	2.13	1.60	0.18	ND
Lysine	0.10	0.09	0.07	0.06
Total	45.85	22.65	12.44	10.43

¹CYA means the sum of cysteic acid and cysteine

라. 무기질 함량 변화

무기질은 차의 품질이나 정미성분과 직접적인 관계는 없으나 생체대사에 있어 필수불가결한 성분이다. 채엽시기에 따른 녹차의 무기질 함량을 분석한 결과는 Table 6에 나타난 바와 같이 Fe, Mn 및 Mg는 채엽시기가 늦어질수록 증가하는 경향을 나타냈으며 Cu는 채엽시기가 늦어질수록 감소하는 경향을 나타내 Hasselo 등의 보고와 일치하는 경향을 보였다. 그러나 Na은 채엽시기에 따라 일정한 경향을 보이지 않는 것으로 나타났다.

Table 6. Change of mineral contents in green tea leaves at different plucking time

	Contents(mg/kg)			
	4	5	6	7
Fe	72.8±0.21	86.1±0.05	105.1±0.20	119.6±0.26
Mn	940±1.02	1149±1.01	1300±1.38	1553±5.39
Mg	1283±1.06	1362±0.75	1528±0.41	1620±2.15
Cu	7.23±0.01	6.54±0.01	4.36±0.01	3.97±0.01
Na	223±0.18	102.3±0.06	138±0.03	87.7±0.01

2. 국내산 녹차의 산지별 녹차성분 분석

국내산 녹차의 산지별 녹차성분 비교를 위해 4월에 채취한 녹차엽을 사용하여 카테킨, 카페인, 유리아미노산 및 무기질을 분석하였다.

가. 카테킨 함량

녹차의 산지별 카테킨 함량 및 조성 분석 결과는 Table 7에 나타난

바와 같다. 녹차엽 중의 카테킨 조성은 채엽장소에 따라 약간 상이하게 나타났는데 경남 하동산은 EGCg가, 전남 보성산은 EGC가 그리고 광주 무등산은 EGC와 EGCg가 가장 많이 함유되어 있었다. 총 카테킨 함량은 경남 하동 33.01mg/g, 전남 보성 36.61 mg/g 및 광주 무등산 34.07 mg/g으로 채엽장소에 따라 차이가 있었다.

Table 7. Contents of catechins and caffeine in green tea leaves at different sampling places

	Contents(mg/g)		
	Hadong	Posong	Mudungsan
GC	4.79±0.252	4.07±0.100	4.02±0.251
EGC	7.02±0.888	10.80±0.126	8.45±2.115
C	1.41±0.092	1.69±0.003	1.49±0.133
EC	3.73±0.217	6.81±0.074	5.23±0.693
EGCg	8.47±1.014	8.54±0.054	8.45±1.465
GCg	2.82±0.413	1.20±0.047	1.91±0.131
ECg	4.68±0.530	3.25±0.003	4.47±0.861
Cg	0.09±0.033	0.25±0.001	0.05±0.009
Total catechin	33.01	36.61	34.07
Caffeine	20.34±0.331	18.56±0.011	19.40±0.864

나. 카페인 함량

녹차의 산지 및 채엽장소에 따른 카페인 분석 결과는 Table 7에 나타낸 바와 같이 경남 하동 20.34mg/g, 전남 보성 18.56 mg/g 및 광주 무등산 19.40 mg/g으로 전남 보성산 녹차에 카페인 이 비교적 적게 함유되어 있었다.

다. 유리 아미노산 함량

녹차의 채엽장소 및 채엽시기에 따른 유리 아미노산 함량 변화는 Table 8에 나타낸 바와 같다. 총 아미노산 함량은 경남 하동 41.60 mg/g, 전남 보성 42.85 mg/g 및 광주 무등산 39.55 mg/g으로 전남 보성산 차에 많이 함유되어 있었으며 특히, 녹차에 함유된 아미노산 중 중요한 생리적 기능을 갖는 theanine의 경우 전남 보성산 차에 18.73 mg/g으로 다소 많은 양이 함유되어 있었다.

Table 8. Contents of free amino acid in green tea leaves at different sampling places

	Contents(mg/g)		
	Hadong	Posong	Mudungsan
Aspartic acid	1.98	1.92	3.04
Glutamic acid	2.24	2.97	2.66
Asparagine	4.55	0.33	1.53
Serine	1.46	0.84	0.94
Glutamine	1.71	3.73	1.53
Glycine	0.11	0.07	0.07
Histidine	0.80	0.47	0.68
Arginine	3.64	5.91	5.05
Threonine	0.65	0.18	0.45
Alanine	4.59	3.54	4.36
GABA	0.57	0.49	0.38
Proline	0.72	0.16	0.42
Theanine	12.99	18.73	14.58
Tyrosine	0.54	0.15	0.41
Valine	1.27	0.35	0.90
Methionine	0.20	0.14	0.17
Cystine	0.28	ND	0.33
Isoleucine	0.76	0.20	0.41
Leucine	1.01	0.18	0.58
Phenylalanine	0.79	0.26	0.60
Tryptophan	0.37	2.13	0.27
Lysine	0.37	0.10	0.19
Total	41.60	42.85	39.55

라. 무기질 함량

채엽장소에 따른 녹차의 무기질 함량을 분석한 결과는 Table 9에 나타낸 바와 같다. Fe, Mg 및 Cu는 경남 하동산 녹차에 가장 많이 함유되어 있었으며 Mn과 Na는 전남 보성산 녹차에 가장 많이 함유되어 있었다. 광주 무등산 녹차는 다른 녹차에 비해 무기질이 다소 적게 함유되어 있었다.

Table 9. Contents of mineral in green tea leaves at different sampling places

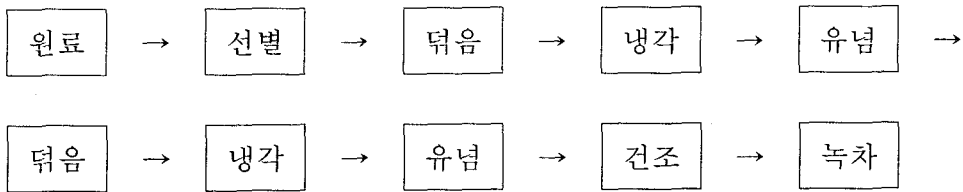
	Contents(mg/g)		
	hadong	Posong	Mudungsan
Fe	203.3±0.02	72.8±0.21	58.3±0.21
Mn	307±0.99	940±1.02	405±0.02
Mg	1291±0.41	1283±1.06	712±0.44
Cu	10.1±0.02	7.23±0.01	3.92±0.01
Na	130±0.10	223±0.18	74.0±0.01

3. 국내산 녹차의 가공방법에 따른 녹차성분 비교

가. 제조공정

녹차생엽의 가공방법에 따른 덫음차 및 증제차 제조공정은 보성군 한농가에서 5월중에 채취한 녹차엽을 가지고 Fig. 1과 같은 방법으로 각각 제조하여 녹차성분을 분석하였다.

Roasted Tea



Steamed Tea

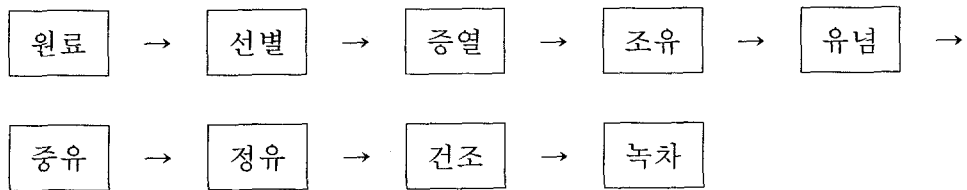


Fig. 1. The processing of roasted and steamed green teas.

나. 카테킨 함량

녹차생엽의 가공방법에 따른 카테킨 분석결과는 Table 10에 나타낸 바와 같이 총 카테킨 함량은 덫음식 녹차가 45.29 mg/g, 증제식 녹차가 47.26 mg/g으로 덫음식 녹차가 증제식 녹차에 비해 다소 낮게 나타났다.

다. 카페인 함량

녹차생엽의 가공방법에 따른 카페인 분석결과는 Table 10에 나타낸 바와 같이 덫음식 녹차가 15.98 mg/g, 증제식 녹차가 17.41 mg/g으로 덫음식 녹차가 증제식 녹차에 비해 다소 낮게 나타났다.

라. 유리 아미노산 함량

녹차생엽의 가공방법에 따른 유리아미노산 분석결과는 Table 11에 나타내었다. 덫음식 녹차에는 23.84 mg/g, 증제식 녹차에는 24.0 mg/g이 함유되어 있어 가공방법에 따라 거의 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table 10. Content of catechins and caffeine in green tea leaves at different processing method

	Content(mg/g)								
	GC	EGC	C	EC	EGCg	GCg	ECg	Total Caffeine	
Roasted green tea	2.02	20.24	0.89	7.76	9.97	0.42	3.99	45.29	15.98
Steamed green tea	2.11	23.99	0.69	7.86	8.81	0.36	3.44	47.26	17.41

Table 11. Content of free amino acid in green tea leaves at different processing method

	Content(mg/g)	
	Roasted green tea	Steamed green tea
GABA	0.09	0.19
ASX*	1.79	1.81
GLX**	2.16	2.19
Ser	0.84	0.80
Gly	0.08	0.08
His	0.27	0.25
Arg	4.04	3.99
Thr	0.28	0.28
Ala	0.68	0.67
Pro	0.08	0.13
Tyr	0.15	0.20
Val	0.58	0.64
Met	0.20	0.18
Thea	8.70	8.68
Ile	0.34	0.36
Leu	0.20	0.23
Phe	2.58	2.55
Trp	0.38	0.31
Lys	0.40	0.46
Total	23.84	24.0

ASX*: The sum of asparagine and aspartic acid

GLX**: The sum of glutamine and glutamic acid

4. 국내산 녹차와 일본산 녹차의 주요 녹차성분 비교

국내산 녹차와 일본산 녹차의 주요 녹차성분 비교를 위해 국내산 녹차는 전남 보성의 한 다원에서 채취하여 가공된 4월차 우전을 사용하였으며, 일본산 녹차는 일본 정강시의 한 다원에서 4월에 제조된 옥로를 사용하여 카테킨, 카페인, 유리 아미노산 및 무기질을 분석하였다.

가. 카테킨 함량

국내산 녹차와 일본산 녹차의 카테킨 분석 결과는 Table 12에 나타낸 바와 같다. 녹차엽 중의 카테킨 조성은 다소 차이가 있었으나 국내산 및 일본산 모두 EGC가 가장 많이 함유되어 있었다. 총카테킨 함량은 국내산 녹차 38.61mg/g, 일본산 녹차 34.91 mg/g으로 국내산 녹차에 더 많이 함유되어 있었다.

Table 12. Contents of catechins and caffeine in Korean and Japanese green tea

	Contents(mg/g)	
	Korean green tea	Japanese green tea
GC	4.07±0.100	5.34±0.299
EGC	13.80±0.126	12.29±1.463
C	1.69±0.003	1.18±0.064
EC	5.81±0.074	4.38±0.307
EGCg	8.54±0.054	7.22±0.896
GCg	1.20±0.047	2.02±0.248
ECg	3.25±0.003	2.12±0.227
Cg	0.25±0.001	0.36±0.009
Total catechin	38.61	34.91
Caffeine	17.56±0.011	19.69±0.464

나. 카페인 함량

국내산 녹차와 일본산 녹차의 카페인 분석 결과는 Table 12에 나타낸 바와 같이 국내산 녹차 17.56mg/g, 일본산 녹차 19.69 mg/g으로 일본산 녹차에 더 많이 함유되어 있었다.

다. 유리 아미노산 함량

국내산 녹차와 일본산 녹차의 유리 아미노산 함량 분석결과는 Table 13에 나타낸 바와 같다. 총 유리아미노산 함량은 국내산 녹차 44.85mg/g, 일본산 녹차 33.78 mg/g으로 국내산 녹차에 현저히 많이 함유되어 있었으며 특히, 녹차에 함유된 아미노산 중 중요한 생리적 기능을 갖는 theanine 및 arginine이 국내산 녹차에 많이 함유되어 있는 것으로 나타났다.

Table 13. Contents of free amino acid in Korean and Japanese green tea

	Contents(mg/g)	
	Korean green tea	Japanese green tea
Aspartic acid	1.92	2.16
Glutamic acid	2.97	1.92
Asparagine	0.33	0.40
Serine	0.84	0.48
Glutamine	3.73	1.17
Glycine	0.07	0.05
Histidine	0.47	0.34
Arginine	5.91	3.92
Threonine	0.18	0.21
Alanine	3.54	4.20
GABA	0.49	0.34
Proline	0.16	0.17
Theanine	21.73	16.06
Tyrosine	0.15	0.25
Valine	0.35	0.71
Methionine	0.14	0.11
Cystine	ND	0.16
Isoleucine	0.20	0.24
Leucine	0.18	0.32
Phenylalanine	0.26	0.30
Tryptophan	1.13	0.18
Lysine	0.10	0.09
Total	44.85	33.78

라. 무기질 함량

국내산 녹차와 일본산 녹차의 무기질 함량을 분석한 결과는 Table 14에 나타낸바와 같다. Na와 Mn은 보성산 녹차에 더 많이 함유되어 있었고 Fe, Mg 및 Cu는 일본산 옥로에 더 많이 함유되어 있었다.

Table 14. Contents of mineral in Korean and Japanese green tea

	Contents(mg/kg)	
	Korean green tea	Japanese green tea
Fe	72.8±0.21	116.1±0.01
Mn	940±1.02	504±0.75
Mg	1283±1.06	1379±0.30
Cu	7.23±0.01	11.0±0.02
Na	223±0.18	89.8±0.03

5. 국내산 녹차와 일본산 녹차의 기능성 성분 비교

가. 시료의 카테킨 및 카페인 조성

국내산 녹차와 일본산 녹차의 기능성 성분 비교를 위해 각각 4월에 채취하여 가공된 녹차엽을 사용하여 EtOH 추출분말 및 조카테킨을 얻은 후 카테킨 조성과 카페인 함량을 분석한 결과는 Table 15에 나타낸 바와 같다. 국내산 녹차의 EtOH 추출분말의 총카테킨 함량은 245.65 mg/g이고 조카테킨의 총카테킨 함량은 648.53 mg/g으로 나타났으며 일본산 녹차의 EtOH 추출분말의 총카테킨 함량은 264.26 mg/g이고 조카테킨의 총카테킨 함량은 651.71 mg/g으로 나타났다.

Table 15. The composition of green tea extracts

	Contents(mg/g)			
	Korean green tea		Japanese green tea	
	EtOH powder	Crude catechin	EtOH powder	Crude catechin
GC	3.66±0.024	6.79±0.132	10.40±0.151	6.57±0.117
EGC	37.31±0.261	98.10±1.298	34.30±1.066	121.36±1.724
C	2.64±0.006	6.74±0.116	2.56±0.013	3.34±0.054
EC	17.55±0.070	50.78±0.691	18.55±0.263	47.89±0.651
EGCg	130.11±0.953	360.80±1.980	150.20±0.947	392.24±0.233
GCg	5.35±0.005	1.17±0.030	16.20±0.255	2.92±0.085
ECg	49.03±0.020	124.15±5.567	31.61±0.059	77.39±0.753
Cg	-	-	0.45±0.022	-
Total	245.65	648.53	264.26	651.71
Caffeine	70.80±0.555	19.27±0.299	98.50±1.218	22.99±0.246

나. 전자공여도

지질의 산화는 주로 free radical에 의한 연쇄반응으로 생성되는 과산화물의 생성과 과산화물이 산화 분해되어 카르보닐 화합물 및 중합물을 생성한다. 전자공여도는 지질 과산화의 연쇄반응에 관여하는 산화성 활성 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제시키는 척도로서 조카테킨 및 BHT, EGCg를 사용하여 각각의 농도에 따른 전자공여도를 측정된 결과는 Fig. 2에 나타낸 바와 같다. 일정 농도로 반응시킬 경우 조카테킨 및 EGCg가 BHT에 비해 우수한 것으로 나타났으며 국내산 및 일본산의 조카테킨 간에는 별다른 차이가 없는 것으로 나타났다. 각 시료의 농도에 따른 전자공여도의 경향을 살펴보면 국내산 및 일본산 카테킨의 경우는 60 ppm까지는 시료의 농도에 비례하여 전자공여능이 높아지다가 60 ppm 이후부터는 거의 변화가 없었으며 EGCg의 경우는 40 ppm까지는 전자공여능이 증가하다가 40 ppm 이후부터는 거의 변화가 없었다. 그리고 BHT의 경우는 600 ppm까지는 전자공여능이 BHT의 농도에 따라 증가하다가 600 ppm 이후부터는 거의 변함없이 일정하였다. 60 ppm 이하의 저농도에서는 EGCg의 전자공여효과가 가장 크게 나타났으나 600 ppm 이상의 고농도에서는 각 처리구가 비슷하게 나타났다.

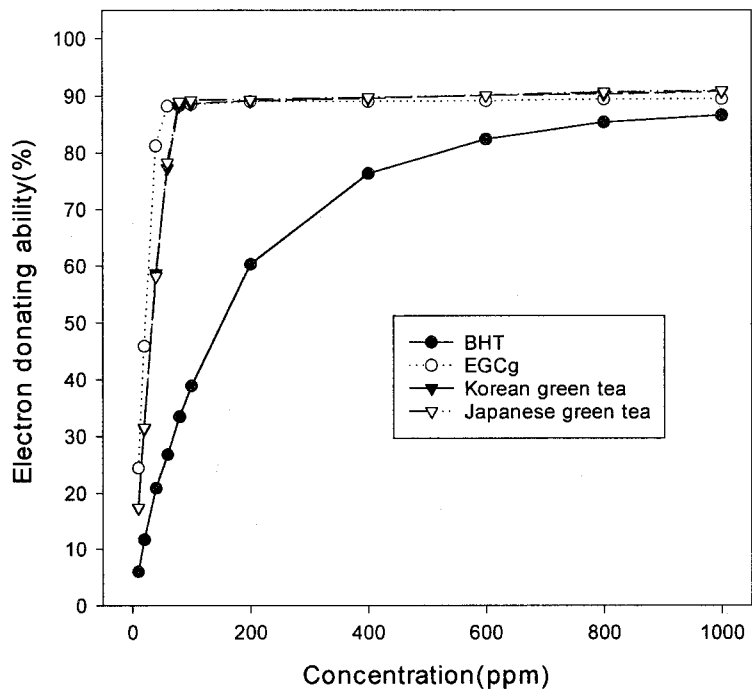


Fig. 2. Electron donating abilities of BHT, EGCg, Korean green tea and Japanese green tea at various concentrations.

다. 과산화물가(POV)

본 실험에서는 대두유를 사용하여 국내산 및 일본산 녹차의 조카테킨에 대한 항산화성을 조사하고 기존에 사용되고 있는 합성 항산화제의 항산화성과 비교하고자 다음과 같은 방법으로 과산화물가를 측정하였다. 국내산 및 일본산 녹차의 조카테킨, 표준품 EGCg 및 합성 항산화제 BHT를 각각 200 ppm 수준으로 첨가하여 50℃ 항온기에 저장하면서 일정 간격으로 분취하여 과산화물가를 측정하였다.

Fig. 3은 녹차 조카테킨과 합성 항산화제가 과산화물가에 미치는 영향을 측정한 결과로서 12주 저장 후의 과산화물가는 대조구 29.13 meq/kg, BHT 24.02 meq/kg, EGCg 13.61 meq/kg, 국내산 조카테킨 15.81 meq/kg 및 일본산 조카테킨 14.82 meq/kg으로 국내산 조카테킨, 일본산 조카테킨 및 EGCg의 항산화 효과가 우수한 것으로 나타났다. 이러한 녹차의 유효 항산화 성분은 주로 EGCg와 EGC에 의한 것으로 알려져 있으며 본 실험에서도 이러한 유효성분에 의해 항산화 효과가 크게 나타난 것으로 사료된다.

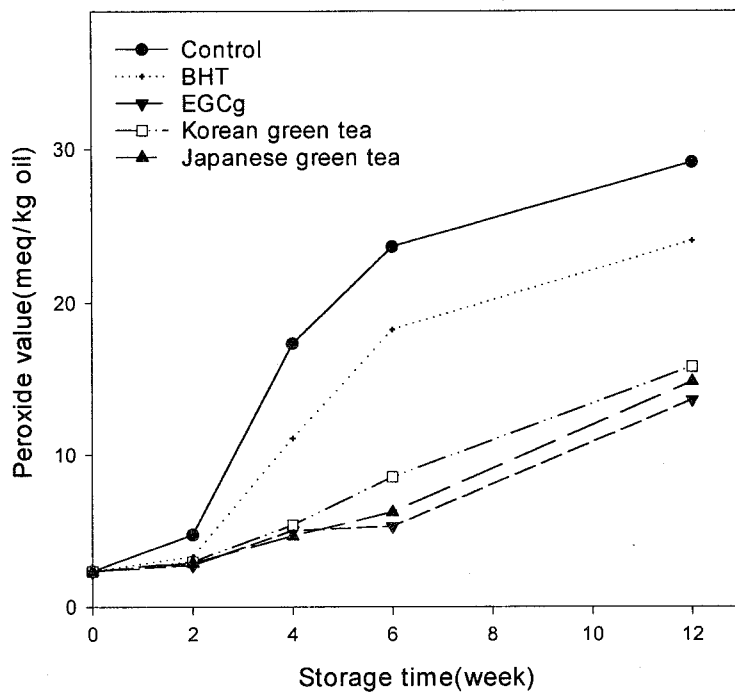


Fig. 3. Peroxide value of control, BHT, EGCg, Korean green tea and Japanese green tea during the storage at 50°C incubator.

라. Angiotensin 변환 효소(ACE) 저해작용

국내산 녹차와 일본산 녹차의 추출물별 ACE 저해작용은 Table 16에 나타낸바와 같이 EtOH 추출분말이 crude catechin 보다 2배정도 더 높은 ACE 저해능을 보였으며 국내산과 일본산과의 차이는 별로 없는 것으로 나타났다. ACE(Angiotensin I converting enzyme)는 고혈압 중 90% 이상을 차지하는 angiotensin계 물질이 중심이 되는 시스템에 관련하는 효소로 angiotensin I에 작용하여 혈관수축 등의 강한 혈압상승작용을 갖는 angiotensin II를 생성한다고 알려져 있다. 최근 ACE 저해제가 합성되어 치료법으로 임상에 사용되었고 Hara 등에 의하면 차성분 중 카테킨류와 theaflavin류가 강한 ACE 저해능이 있다고 보고한 바 있다.

Table 16. Inhibition of angiotensin I converting enzyme by green tea extracts

	ACE inhibition(%)			
	Korean green tea		Japanese green tea	
	EtOH powder	Crude catechin	EtOH powder	Crude catechin
500ppm	43.61	23.30	40.67	22.23
1000ppm	103.21	68.47	107.48	41.74
Captopril ¹⁾				
1.25×10 ⁻⁴ M	4.33			
2.5×10 ⁻⁴ M	25.44			
5.0×10 ⁻⁴ M	52.43			
1.0×10 ⁻³ M	113.90			

¹⁾ captopril is a very strong ACE inhibitor

마. 항충치 효과

충치는 세균에 의해 감염되는 구강질환이다. 구강 미생물 중 특히 *Streptococcus mutans*가 중요 원인 균주로 작용하는데 이러한 구강질환을 억제하기 위하여 항생제 및 항소독제 등을 제한적으로 사용하고 있어 부작용이 따르고 있다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 천연 식물체 즉 녹차, 으름덩굴, 계피, 황려, 드릅나무 추출물과 키토산, funoran, propolis, flavonoid 등의 물질 등에서 항충치 효과에 대한 연구가 진행중에 있다. 본 실험에서는 녹차 추출물의 항충치 효과를 비교하기 위해 국내산 및 일본산 녹차 추출물을 대상으로 구강질환 주 원인균인 *Streptococcus mutans*에 대한 항충치 효과를 검토하였다.

Table 17에서 보는바와 같이 충치균 *Streptococcus mutans*에 대한 최소생육저해농도(MIC)는 EtOH 추출분말 보다 조카테킨에서 항충치균에 대한 효과가 좋았으며 국내산과 일본산 간의 차이는 거의 없었다. 또한 각 처리구 모두 카테킨 단일 물질인 EGCg 보다는 항충치균에 대한 효과가 좋은 것으로 나타났다.

Table 17. Minimum inhibition concentrations(MIC) of various extracts of green tea on *Streptococcus mutans*

		MIC(μ g/mL)
		<i>Streptococcus mutans</i> 1171
EGCg		5,000
Korean green tea	EtOH extract powder	4,500
	Crude catechin	4,000
Japanese green tea	EtOH extract powder	4,500
	Crude catechin	4,000

여 백

Part 2. 녹차를 이용한 숙취해소제의 개발

제1절 서설

녹차에는 카테킨, 아미노산, 비타민 등이 함유되어 있으며, 특히 녹차 카테킨류는 알콜분해 과정에서 생성되는 활성산소를 억제하여 간 독성을 억제하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 알콜과 알데하이드 독성을 감소시킬 수 있는 thiol 고함유 생약재 및 문헌상 주독(酒毒)에 대해 효능·효과를 가지며 주치병증으로 처방된 어성초외 34종 생약재를 중심으로 신소재를 탐색하였다. 혈중 알콜농도 저하 효과, 알콜에 의한 물질대사 교란 억제 효과 및 알콜유발 간 TG 억제 효능을 주요 지표로 사용하였다.

숙취는 음주 다음날 알콜이 체내에 거의 없을 때 나타나는 두통, 구토, 오심 등에 의한 불쾌감으로 정의되며, 메틸 알콜, 퓨젤 등의 술의 불순물, 알콜대사산물 아세트알데하이드의 독성 작용, 알콜에 의한 세포막 혼란, 당(glucose)이용률 저하 등 여러 인자에 의한 것으로 보고되고 있다. 간으로 흡수·대사되는 음주 초기의 알콜의 양을 줄이는 것이 과도한 AcH의 생성을 방지하므로 혈중 알콜농도 저하 효과를 검증하였다.

알콜은 췌장에서 분비되는 소화 효소들의 분비를 억제하고 위장 및 소장에서 각종 영양분들의 흡수를 억제한다. 갑자기 폭음을 하면 “알콜성 저혈당증”이 일어난다. 알콜성 저혈당증은 알콜이 당의 신생(新生)을 막고 음식 섭취를 감소시켜 간에 저장되어 있던 당원 글리코젠을 써버리게 되어 생긴다.

또한 단시간에 과량의 알콜을 섭취하면 간의 여러 가지 기능, 즉 지질 산화나 소포체에서의 약물대사 등에 방해받게 되고, 만성적으로 알콜을 섭취하면 적응성이 생겨 초기에는 알콜 및 약물대사가 증가하고 지단백질의 생성이 가속화되지만, 지속적인 알콜 섭취로 인하여 간기능이

저하되고 간세포의 손상을 초래한다. 급·만성 알콜 섭취시 상기의 여러 기전이 직·간접으로 지방산을 합성에 관여하여, 간세포와 그 주위에 조직에 중성지방이 침착하게 되면 간세포가 불활성상태에 빠지게 되고 간 기능 장애가 일어나며, 지방간(fatty liver)라는 병리적 현상을 초래한다. 간에 지방이 침착하게 되면 기능장애가 일어나서 영양, 면역, 대사 등의 역할을 충분히 수행할 수 없을 뿐만 아니라 급성중독성 간염, 간경화, 나아가서는 간암으로 치닫게 되는 악순환의 디딤돌이 될 수 있다.

과잉 또는 만성적인 알콜(에탄올) 섭취는 지방간, 간경변 그리고 간염 등을 초래함을 동물실험과 인체실험을 통해 밝혀진 후 알콜은 여러 가지 대사 이상을 가져오는 원인 물질로 잘 알려져 있다. 알콜로 인한 대사 이상은 직접적인 알콜 자체의 독성뿐만 아니라 사회적, 경제적 문제로 대두되어 그 양상이 날로 심각해지고 있다. 또한 만성적 또는 과잉의 알콜 섭취는 간 질환을 유발한다. 일단 간 질환이 발병하면 만성적으로 악화될 가능성이 높고 치료가 힘든 질병의 하나이며, 우리나라에서 매우 발병 빈도가 높은 질환 중의 하나이다. 우리나라의 세대별 사망 원인을 보면, 간 질환은 40대의 사망 원인 중 41%로 가장 으뜸을 차지한다. 전체 간질환 환자 중에 순수한 알콜성 간 질환 환자가 14%를 차지하며, 음주량과 음주 기간에 따라 다소의 차이가 있으나, 습관성 음주자의 경우 간 손상 발병 빈도는 30~50% 정도로 알려져 있다. 알콜성 간질환은 증상에 따라 알콜성 지방간, 알콜성 간염, 알콜성 간경변증으로 크게 나눌 수 있다. 알콜성 지방간은 초기에 경하게 증상이 나타나는 질환으로서 피로감, 나른함, 권태감, 식욕부진 등 비특이적인 증상을 보이기 때문에 자각하지 못하는 경우가 많으며 알콜성 간염 및 간경변증으로 진전된다.

본 연구과제에서는 알콜성 간질환의 초기 증상인 지방간에 초점을 맞추어, 동물실험 및 임상실험에 적용 가능한 모델을 설정하여, 급성 알콜성

질환에 대한 녹차생약복방제의 예방 효과를 검증하고, 제품화에 연계 및 녹차 주제의 고부가가치 기능성 제품을 개발하는 데 목적이 있다.

제2절 재료 및 방법

1. 실험 동물

본 실험에 사용한 실험 동물은 대한바이오 링크에서 사육된 흰쥐(S.D rat $200 \pm 10g$, ♂)와 생쥐(ICR mouse, $20 \pm 2g$, ♂)를 구입하여 사용하였다. 구입한 실험 동물은 당 연구소 동물 실험실에서 5일간 순응시켜 실험에 사용하였다.

2. 녹차 및 생약재의 효능 검증 Protocol

실험 전일 오전 10시부터 24시간 절식시킨 흰쥐(S.D. rat, $200 \pm 10g$, ♂)를 무작위로 선별하여 3개의 실험군으로 설정하여(실험군당 5마리 사용, 3회 반복) 알콜($5g/kg$ 또는 $7g/kg$)과 녹차 및 생약추출물을 경구투여하였다. 알콜의 체내흡수율은 위장관내에 잔존하는 음식물량에 따라 크게 좌우되므로, 24시간 절식쥐를 대상으로 알콜 흡수 및 동태에 대한 녹차의 효능을 검증하였다(쥐의 경우 위장관내에 음식이 머무는 평균 시간은 28시간임). 또한 circadian rhythm에 따라 생체내 알콜대사능이 달라지므로, 알콜은 오전 10시에 경구투여 하였다.

3. 연구용 시료의 제조

본 실험에 사용된 국내산 녹차는 전남 보성의 한 다원에서 구입한 4월차 우전을 사용하였으며 일본산 녹차는 정강시의 한 다원에서 제조된 옥로를 사용하여 $80^\circ C$ 에서 30분간 침출하여 연구용 시료로 사용하였다. 기타 생약재는 세절하여 건물의 10배 양의 물을 사용하여 $100^\circ C$ 내외로

2~4시간 동안 추출기로 추출하여 농축 건조시켜 추출물 분말을 얻어 사용하였다.

4. 녹차생약복방제 시제품제조

동물실험에서 유의적으로 혈중 알콜농도 감소 효과와 항지방간 효능을 나타내는 녹차생약복방제의 처방(배합 비율)을 토대로 추출수율을 고려하여 원생약재의 배합 조성을 산출하여 제조하였다

5. 혈청 및 간 내의 lipid content 측정

혈청의 triglyceride(TG)는 아산제약 kit를 사용하여 측정하였고, 간 내의 TG는 Biggs 등의 방법을 사용하여 측정하였다.

6. 혈중 알콜농도 측정

혈청 내의 알콜정량은 B.M kit를 사용하였다.

7. 혈청의 간 손상지표 측정

혈청의 glucose, triglyceride(TG), BUN, creatinine은 아산제약 kit를 사용하여 비색정량법으로 측정하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 녹차 추출물의 알콜해독 및 간 기능 보호 효능 연구(in vivo)

가. 녹차의 효능 검정

1) 녹차 추출물별 혈중 알콜농도(BAC) 감소 효과 비교

1일 절식 SD계 웅성 흰쥐(6주령, $200 \pm 10g$)에 알콜(5g/kg)과 녹차 추출물(100mg/kg)을 경구투여하였으며, 혈중 알콜농도가 최대치에 도달하는 알콜투여 1시간 후에 채혈하여 녹차 추출물별 혈중 알콜농도 감소 효과를 비교하였다(Table 18). 녹차 물추출물 투여로 알콜대조군 대비 혈중 알콜농도가 24% 낮아졌으며, 녹차 알콜추출물(9% 감소) 보다 효능이 우수한 것으로 평가되었다. 녹차 물추출물 용량별 실험 결과, 400mg/kg 이상의 고용량에서 알콜에 의한 sleep유도시간이 $164 \pm 47min$ 에서 $254 \pm 39min$ 으로 연장되고 sleep시간이 $121 \pm 45min$ 에서 $85 \pm 35min$ 으로 단축되었으나, 녹차 추출물간에는 유의한 차이는 없었다.

Table 18. 녹차의 혈중 알콜농도에 미치는 영향¹⁾

실 험 군	혈중 알콜농도(mg/dl)
알콜 대조군	$374 \pm 45^{2)}$
녹차 물추출물 투여군	284 ± 21
녹차 알콜추출물 투여군	342 ± 76

¹⁾ 1일 절식 SD계 웅성 흰쥐(6주령, $200 \pm 10g$, $n=5$)에 알콜(5g/kg, 25%, po, 오전 10시)을 투여, 1시간후 채혈(heart puncture)하여 혈중 알콜농도를 측정함. 녹차 추출물(100mg/kg, po)은 알콜과 동시투여함

²⁾ $p < 0.05$ (알콜투여 대조군 vs 녹차 추출물 투여군)

2) 알콜유발 물질대사 교란에 미치는 녹차 추출물별 효능 비교

체내에 흡수된 알콜이 대사(산화)됨에 따라 체내에 NADH가 축적되어 redox state 변화(NADH/NAD⁺ 비율 증가)가 일어나며, 알콜에 의한 당이용률 저하 등으로 혈당 상승 등 물질대사 교란이 일어나는 것으로 보고되었다. 녹차 물추출물 투여로 알콜에 의한 물질대사 교란이 억제되었다(Table 19).

Creatinine과 BUN(Blood Urea Nitrogen)은 각기 근육 에너지대사 및 단백대사와 관련이 깊은 것으로 보고되었다. 급속 다량 알콜투여로 혈청내 creatinine농도가 단시간내 유의적으로 증가하며, 녹차 물추출물 투여로 정상 수준으로 회복되었다(p<0.05). 녹차 알콜추출물은 알콜에 의한 물질대사 교란 억제 효과가 적은 것으로 나타났다(Table 19).

Table 19. 알콜투여쥐¹⁾의 임상학적 지표에 미치는 녹차 추출물의 영향¹⁾

실 험 군	Glucose (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	BUN (mg/dl)
정상군	80.3±12.8	0.57±0.25	14.8±0.6
알콜 대조군	104.3±17.5	0.83±0.28	14.9±0.7
녹차 물추출물 투여군	81.8±15.2	0.56±0.10 ²⁾	15.1±0.6
녹차 알콜추출물 투여군	88.0±13.4	0.80±0.19	14.7±2.6

¹⁾1일 절식 SD계 웅성 흰쥐(6주령, 200±10g, n=5)에 알콜(5g/kg, 25%, po, 오전 10시)을 투여, 1시간후 채혈(heart puncture)하였으며, 추출물(100mg/kg, po)은 알콜과 동시투여함.

²⁾p < 0.05 (알콜투여 대조군 vs 녹차 추출물 투여군)

나. 녹차 물추출물의 용량별 효능 검정

1) sleep 유도시간 지연 및 sleep time 단축에 미치는 효과

고용량 알콜에 의한 초기의 행동 반응에 미치는 녹차의 효능을 관찰하고자, 알콜유발 sleep 유도시간 및 sleep time을 측정하였다. 고용량 알콜을 투여하면 다음과 같은 행동적 변화가 나타난다. 뒷다리를 끌며 걷다(점수 '1'), 뒤집어 놓으면 정상 자세를 취하나, 다리를 끌며 걷다(점수 '2'), 뒤집어 놓아도 그대로 있으며, 정상 자세로 원위치 되지 않는다(righting reflex, sleep time, 점수 '3'). 정상을 점수 '0'으로 하여 알콜 대조군과 녹차투여 실험군의 행동 변화를 녹차 물추출물 용량별로 경시적(0~10시간)으로 관찰하였다(Fig. 4). Sleep 유도시간 및 sleep time에 대한 녹차 물추출물의 효과를 검정한 결과, 녹차 물추출물 병용투여로 알콜유발 sleep 유도시간이 유의적으로 연장되었고, 또한 sleep 시간이 유의적으로 감소되었다.

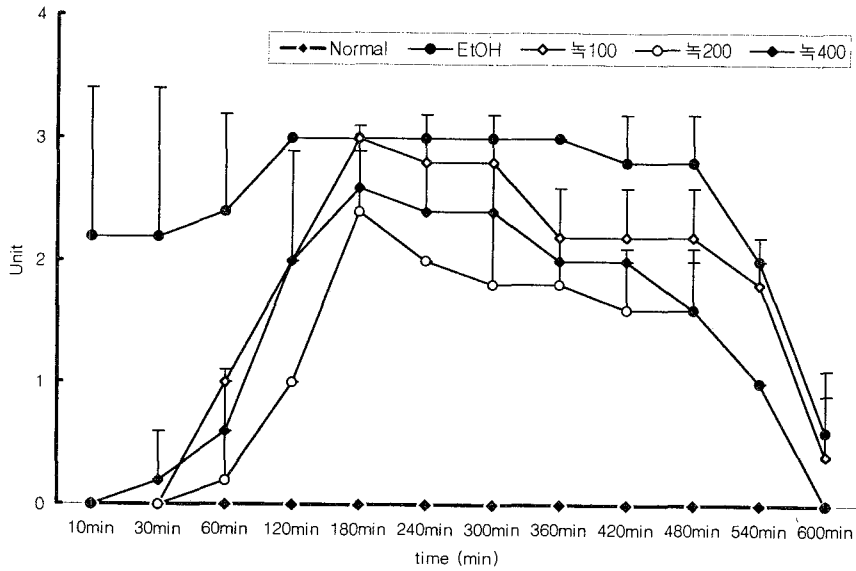


Fig. 4. Effect of green tea water extract dose on alcohol-induced sleep time(righting reflex) in rat

[註] 알콜 단독 및 녹차 추출물 병용투여 후 나타나는 행동학적 변화를 다음과 같은 지표를 설정하여 조사함. 정상(점수 0), 뒷다리를 끌며 걷다(점수 1), 뒤집어 놓으면 정상자세를 취하나, 다리를 끌며 걷다(점수 2), 뒤집어 놓아도 그대로 있으며, 정상 자세로 원위치 되지 않는다(righting reflex, sleep time: 점수 3).

2) 알콜투여 6시간 후의 혈중 알콜농도 및 임상학적 지표에 미치는 효과
 녹차 물추출물 용량별(100, 200, 400mg/kg) 고용량 알콜(7g/kg) 투여 6시간 후의 혈중 알콜농도 및 알콜에 의한 물질대사 교란 억제 효과를 검증하였다(Table 20). 녹차 물추출물 200mg/kg 이상의 용량에서 혈중 알콜농도가 유의적으로 낮아졌고($p < 0.05$), 고혈당이 유의적으로 개선되었으나, 혈중 TG가 알콜대조군 대비 100% 증가하였다.

Table 20. 알콜투여 6시간 후의 임상학적 지표에 미치는 녹차 물추출물 용량별 효과¹⁾

실험군	혈중알콜농도 (mg/dl)	간 TG (mg/g-liver)	s-TG (mg/dl)	혈당 (mg/dl)
정상군	-	5.81±0.86	56.9±13.1	72.4±5.8
알콜 투여군	450.1±134.4	5.38±0.79	52.7±14.0	272.5±96.2
녹차(100mg/kg)	421.4±47.5	5.73±0.79	50.5±13.3	178.9±89.6
녹차(200mg/kg)	254.3±78.5 ²⁾	5.86±0.79	104.5±53.1 ²⁾	143.2±21.0 ²⁾
녹차(400mg/kg)	43.4±10.3 ²⁾	5.84±1.02	91.0±14.5 ²⁾	160.8±44.2 ²⁾

¹⁾ 1일 절식 SD계 웅성 흰쥐(6주령, 200±10g, n=5)에 알콜(5g/kg, 25%, po, 오전 10시)을 투여, 6시간 후 채혈(heart puncture)함. 녹차 물추출물(100, 200, 400mg/kg, po)은 알콜과 동시 투여함

²⁾ $p < 0.05$ (알콜투여 대조군 vs 녹차 물추출물 투여군)

3) 알콜투여 24시간 후의 임상학적 지표에 미치는 효과

녹차 물추출물 용량별(100, 200, 400mg/kg) 알콜(고용량, 7g/kg) 투여 24시간 후의 간 내에 축적되는 TG 억제 효과와 혈당 및 사료 물섭취량에 대한 영향을 조사하였다(Table 21). 녹차 물추출물 병용투여로 간 내의

TG 축적이 억제되고 사료 및 물 섭취량이 증가되었다. 그러나 녹차 물추출물 고용량(400mg/kg) 투여로 혈당이 매우 유의적으로 낮아졌으므로 이에 대한 보다 상세한 연구가 필요하다.

Table 21. 알콜투여 24시간 후의 임상학적 지표에 미치는 녹차 물추출물 용량별 효과¹⁾

실 험 군	간 TG (mg/g-liver)	s-TG (mg/dl)	혈당 (mg/dl)	사료섭취량 (g/rat)	물섭취량 (ml/rat)
정상군	3.85±0.63	151.7±8.1	150.1±14.2	23.0	39.0
알콜 투여군	9.05±1.82	171.0±34.0	139.8±24.4	5.6	16.4
녹차(100mg/kg)	7.18±1.46	149.4±11.4	141.2±34.6	8.8	30.4
녹차(200mg/kg)	8.00±1.05	150.8±19.8	155.5±50.5	8.0	24.6
녹차(400mg/kg)	6.63±0.37 ²⁾	175.2±32.5	93.5±23.0 ²⁾	8.0	24.4

¹⁾ 1일 절식 SD계 웅성 흰쥐(6주령, 200±10g, n=5)에 알콜(5g/kg, 25%, po, 오전 10시)을 투여, 24시간 후 채혈(heart puncture)함. 녹차 물추출물(100, 200, 400mg/kg, po)은 알콜과 동시 투여함. 알콜투여 3시간 후부터 사료와 물을 공급하여 21시간 사료 및 물섭취량을 측정함

²⁾ p < 0.05 (알콜투여 대조군 vs 녹차 물추출물 투여군)

다. 국내산 녹차와 일본산 녹차의 효능 비교

1) 혈중 알콜농도(BAC) 감소 효과 및 혈중 중성지방 축적 억제 효과 비교

국내산 녹차 및 일본산 녹차의 혈중 알콜농도 감소 효과와 알콜에 의한 초기 혈중 중성지방 축적 억제 효과를 비교하였다(Table 22). 보성산 녹차의 혈중 알콜농도 감소 효과와 알콜에 의한 초기 혈중 중성지방 축적 억제 효과가 일본 녹차에 비해 우수하였다. 알콜은 10~20%가 위에서 직

접 흡수되고 나머지는 위를 통과해서(gastric emptying) 소장에서 흡수되며, 혈액 중 알콜의 90~95%는 간에서 분해된다. 상기의 녹차의 효능은 위(stomach)에서의 알콜흡수를 저해하거나, 또는 알콜대사능(first pass metabolism)을 촉진시킬 가능성을 시사하며 알콜동태에 대한 보다 상세한 연구가 필요하다. 알콜성 지방간의 혈청지표 중성지방(TG)의 초기 증가 현상은 알콜에 의한 간세포내의 NADH/NAD⁺ ratio 증가, 중성지방의 생성 증가, 혈청 중성지방 증가에 의한 것으로 알려져 있다.

Table 22. 녹차의 혈중 알콜농도 및 혈중 TG에 미치는 영향¹⁾

실험군	혈중 알콜농도 (mg/dl)	혈중 중성지방 (mg/dl)
정상군	-	35.2 ± 9.8
알콜 대조군	320 ± 65	66.2 ± 10.8
우리나라 녹차(보성산) 투여군	250 ± 42 ²⁾	50.5 ± 12.5 ²⁾
일본 녹차(玉露) 투여군	272 ± 45	74.3 ± 22.9

¹⁾1일 절식 SD계 웅성 흰쥐(6주령, 200±10g, n=5)에 알콜(5g/kg, 25%, po, 오전 10시)을 투여, 1시간후 채혈(heart puncture)함. 녹차추출물(100mg/kg, po)은 알콜과 동시투여함

²⁾p < 0.05 (알콜투여 대조군 vs 녹차추출물 투여군)

2. 녹차와 시너지 효과를 갖는 생약재 탐색

숙취 해소 기능과 주독(酒毒)에 대해 효능·효과를 갖는 특수 영양식품 자료 수집을 통해 총 34종의 생약재 추출물을 제조하였다. 동물실험 결과 녹차 물추출물 고용량(400mg/kg)에서 혈중 알콜농도 저하 효과 및 righting reflex(sleep 유도 및 지속) 효과가 월등하나(Table 20) 인체(60kg 체중)에 적용시 1회 음용 녹차량이 60g이므로 원가상승으로 상용화시키기에는 부적합하였다. 특히 고용량의 녹차는 알콜유발 간 TG 억제 효과가 타생약재에 비하여 약하며, 혈중 TG 상승 및 혈당 저하 등의 알콜의 독성을 강하게 하는 작용이 있다. 따라서 보다 안전한 저용량(100mg/kg 미만)에서 녹차의 효능을 증진시킬 생약재의 탐색이 요구된다. 1차 생약재 탐색(Table 23)에서 시료 001과 시료 002가 혈중 알콜농도 저하 효과 및 알콜에 의한 물질대사 교란 억제 효과가 우수하였다. 2차 탐색(Table 24)에서 헛개나무외 7종의 생약재의 효능을 검정하였다. 3차 탐색에서 sleep 유도시간 지연 및 sleep time 단축 효과, 알콜성 중성지방 축적 억제 효과, 체내 항산화 물질 저하 억제 효과, 사료 및 물섭취 증가 효과를 재차 검정하여 녹차와 시너지 효과가 우수한 생약재를 선발하였다.

Table 23. 생약재 탐색 I¹⁾

실험군	혈중 알콜농도 (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	BUN (mg/dl)
알콜투여 대조군	370 ± 20	104.3 ± 17.5	0.83 ± 0.28	14.9 ± 0.7
녹차 물추출물	285 ± 11 ³⁾	81.8 ± 15.2	0.56 ± 0.10 ²⁾	15.1 ± 0.6
녹차 알콜추출물	345 ± 76	88.0 ± 13.4	0.80 ± 0.19	14.7 ± 3.6
시료 001	276 ± 28 ²⁾	69.3 ± 13.1 ³⁾	0.59 ± 0.07 ²⁾	13.6 ± 1.9
시료 002	281 ± 25 ²⁾	74.8 ± 24.1 ²⁾	0.54 ± 0.10 ²⁾	14.7 ± 5.2
시료 003	255 ± 33 ³⁾	109.2 ± 18.2	0.80 ± 0.09	13.9 ± 0.5
시료 004	316 ± 39	107.8 ± 12.5	1.08 ± 0.59	13.3 ± 1.5

¹⁾S.D.계 웅성 흰쥐(1일 절식, 200±10g, n=5)에 오전 10시에 알콜(5g/kg) 및 생약추출물(100mg/kg)을 경구 투여함. 알콜 투여 1시간 후 채혈함

²⁾p < 0.05, ³⁾p < 0.01 (알콜투여 대조군 vs 생약추출물 투여군)

Table 24. 생약재 탐색 II¹⁾

실험군	혈중 알콜농도 (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	BUN (mg/dl)	TG (mg/dl)
정상쥐	-	91.5 ± 9.3	16.2 ± 1.1	25.8 ± 12.4
알콜 투여군	286.1 ± 61.2	99.3 ± 27.3	15.7 ± 2.9	25.6 ± 19.8
헛깨나무 줄기, 100	391.1 ± 57.8	106.9 ± 37.7	18.4 ± 5.7	35.4 ± 31.1
400	333.3 ± 48.2	117.3 ± 25.8	16.7 ± 3.2	26.8 ± 6.6
잎, 100	355.2 ± 35.9	89.6 ± 8.8	18.5 ± 4.1	43.0 ± 26.4
400	345.1 ± 40.3	97.8 ± 12.9	20.5 ± 6.4	31.5 ± 17.4
생열귀 잎, 100	360.7 ± 59.4	106.4 ± 14.6	24.8 ± 7.3 ²⁾	43.0 ± 17.0
400	413.2 ± 53.9	122.9 ± 14.0	20.6 ± 4.8 ²⁾	23.7 ± 12.4

¹⁾S.D.계 웅성 흰쥐(1일 절식, 200±10g, n=5)에 오전 10시에 알콜(5g/kg) 및 생약추출물(100, 400mg/kg)을 경구 투여함. 알콜 투여 1시간 후 채혈함

²⁾p < 0.05 (알콜투여 대조군 vs 생약추출물 투여군)

3. 녹차생약복방제의 효능

가. 녹차생약복방제의 시너지효과 검정

1) 생약 추출물의 알콜에 의한 마취유도 지연 및 마취시간 단축 활성

실험동물로 1일 절식시킨 생쥐(ICR mice, 웅성, 25g)를 대조군(n=5)과 시험군(n=5)으로 나누어 각각 실험에 사용하였다. 알콜(25%, 6g/kg b.w.)를 투여한 후 10시간 동안 행동학적인 변화를 관찰하였다. 마취유도 시간은 실험동물이 마취(생쥐를 엎어놓으면 정상적인 자세로 되돌아오지 않는 상태)될 때까지의 시간이며, 마취시간은 이 상태의 지속시간이다. 사용 시료는 알콜에 100mg/kg 용량으로 희석하여 동시에 투여하였다.

Table 25에서 보는 것과 같이 녹차, 갈근, 초석잠, 복분자, 고과(여주), 영지, 오미자 추출물이 알콜에 의한 마취유도시간을 각각 35, 18, 43, 30, 22, 38, 30% 지연시키며, 또한 마취유도시간을 각각 44, 0, 44, 48, 20, 25, 40% 단축시키는 효과가 있다. 마취유도시간 지연은 알콜의 흡수를 지연시킴을 나타내고, 또한 마취시간의 단축은 알콜이 고농도로 유지되는 시간을 감소시킴을 의미한다.

Table 25. 생약 추출물의 sleep time(righting reflex)에 미치는 영향¹⁾

실험군	마취유도시간		마취시간	
	(min)	(%)	(min)	(%)
알콜 대조군	148 ± 40	(100)	127 ± 32	(100)
녹차 추출물	200 ± 55	(135)	88 ± 38	(56)
갈근 추출물	175 ± 64	(118)	127 ± 41	(100)
초석잠 추출물	207 ± 75	(143)	71 ± 24	(56)
홍삼 추출물	192 ± 78	(130)	66 ± 29	(52)
복분자 추출물	180 ± 55	(122)	101 ± 29	(80)
영지 추출물	204 ± 54	(138)	95 ± 35	(75)
오미자 추출물	193 ± 55	(130)	76 ± 27	(60)

¹⁾ICR 웅성 생쥐(1일 절식, 20±2g, n=5)에 오전 10시에 알콜(6g/kg) 및 생약추출물(100mg/kg)을 경구 투여함

2) 간 내의 중성지방 축적에 대한 생약 추출물의 효과

실험 동물인 흰쥐(S.D rat, 웅성, 200g)를 대조군(n=5)과 시험군(n=5)으로 나누어 각각 실험에 사용하였다. 1일 절식시킨 흰쥐에 알콜(25%, 5g/kg b.w.)를 투여한 후 12시간 후 간 내의 중성지방을 측정하였다 (Table 26). 사용시료는 100mg/kg의 용량으로 알콜에 희석하여 동시에 경구로 투여하였다. 알콜 투여 후 간 내의 TG가 4시간 후부터 축적되며, 12~16시간에서 최대치에 도달하며 그 후 서서히 감소, 48시간이 경과하면 정상 수준으로 회복된다. 생체내 알콜대사에 의한 redox state 변화 (NADH/NAD⁺ 비율증가), 간 내의 fatty acid 합성촉진과 산화억제, TG 생성촉진, TG transport 억제, 알콜대사산물(아세트알데하이드 등) 및 알콜에 의한 호르몬 불균형 등에 의해 간 내에 TG가 축적되어 알콜성 지방간이 생성되는 것으로 보고되고 있으나 아직까지 정확한 기전은 정확히 구명되지 않았다. 체내에 흡수된 알콜을 속히 분해 배출시키고, 알콜 성분을 해독시키는 간의 작용을 정상화시키는 것이 중요하다.

Table 26에서 보는 것과 같이 대조군에 비해 녹차, 갈근, 초석잠, 홍삼, 복분자, 고과(여주), 영지, 오미자 추출물이 각각 30, 27, 25, 25, 27, 14, 23%의 중성지방 축적 억제 효과를 나타내었다.(알콜을 투여하지 않은 정상군의 중성지방 값은 5.5 ±1.0 임)

Table 26. 생약 추출물의 항지방간 효능 비교¹⁾

실험군	간 중성지방 함량	
	mg/g	%
알콜 대조군	10.2 ± 1.2	100
녹차 추출물	8.4 ± 1.2	70
갈근 추출물	7.4 ± 1.1	73
초석잠 추출물	7.6 ± 1.1	75
홍삼 추출물	7.6 ± 1.2	75
복분자 추출물	7.4 ± 1.1	73
영지 추출물	7.9 ± 1.7	77
오미자 추출물	8.8 ± 1.1	86

¹⁾S.D.계 웅성 흰쥐(1일 절식, 200±10g, n=5)에 오전 10시에 알콜(5g/kg) 및 생약추출물(100mg/kg)을 경구 투여함

3) 간 내의 중성지방 축적에 대한 녹차생약복방제의 효과

실험 동물인 흰쥐(S.D rat, 웅성, 220g)을 대조군(n=5)과 시험군(n=5)으로 나누어 각각 실험에 사용하였다. 7시간 절식시킨 흰쥐에 알콜(25%, 5g/kg b.w.)를 투여한 후 12시간 및 22시간 후의 간 내의 중성지방 및 혈액의 알콜농도를 측정하였다. 사용시료는 녹차와 생약 추출물 혼합물(녹차:갈근:초석잠:홍삼:복분자:영지:오미자 = 2:2:1:1:2:2:2)을 100mg/kg의 용량으로 알콜에 희석하여 경구로 투여하였다.

Table 27에서 보는 것과 같이 녹차생약복방제투여군에서 알콜투여 후 12시간에 대조군에 비해 중성지방의 축적이 26%감소했으며, 22시간 후에는 44% 감소하였다. 녹차생약복방제 투여군의 간 내의 TG 축적을 유의적으로 감소시키므로 항지방간 효능이 있음을 나타내고 있다. 이상과

같은 결과는 녹차생약복방제가 stomach에서의 알콜대사능(frist pass metabolism)의 촉진 또는 알콜 흡수 저해(inhibition) 가능성을 시사하며, 간 내의 TG 축적억제 효과는 알콜 대사능의 촉진 및 위에서의 알콜흡수 저해에 의해 혈중 알콜 농도를 낮추어 줌으로써 간의 알콜대사의 부담을 경감시킨 결과라고 추정할 수 있다.

Table 27. 녹차생약복방제의 혈중 알콜농도 저하 및 항지방간 효과¹⁾

구분	시간	혈중 알콜농도 (mg/dl)	간 중성지방 (mg/g-liver)
알콜 대조군	12h	204.2 ± 50.4 (100%)	32.0 ± 9.0 (100%)
	22h	0	35.1 ± 2.8 (100%)
녹차생약복방제	12h	171.6 ± 34.9 (84%)	23.7 ± 6.6 ²⁾ (74%)
	22h	0	19.6 ± 3.9 ²⁾ (56%)

¹⁾S.D.계 웅성 흰쥐(1일 절식, 220±10g, n=5)에 오전 10시에 알콜(5g/kg) 및 생약 추출물(100mg/kg) 을 경구 투여함

²⁾p < 0.05

여 백

Part 3. 녹차의 기능성 성분을 이용한 제품개발

제1절 서설

녹차에는 카테킨, 퓨린염기, 단백질, 아미노산류, 카로티노이드, 플라보논 유도체, 탄수화물, 지질, 정유, 비타민 및 무기성분 등이 함유되어 이들 성분들에 의해 여러 가지 약리효과를 갖는 것으로 알려져 최근 각광을 받고 있다. 녹차의 주 생리기능은 녹차엽 중 10~20% 함유되어 있는 카테킨류에 의하는데 카테킨은 flavans-3-ols을 기본구조로 주로 카테킨, 에피카테킨, 에피갈로카테킨, 에피카테킨갈레이트, 에피갈로카테킨갈레이트, 갈로카테킨, 갈로카테킨갈레이트, 카테킨 갈레이트 등의 8종류가 알려져 있으며 이들은 소취, 항충치, 항균, 항산화, 콜레스테롤 상승억제, 활성산소 소거, 알콜대사 촉진, 암 발생 억제 등 다양한 생리활성 효과를 갖고 있다. 최근 녹차 카테킨이 가지는 생리기능에의 관심이 높아져 세계 각국에서는 생리기능을 증진시킬 수 있는 고농도 카테킨, EGCg 고함유 카테킨, 무카페인 카테킨 등 카테킨 관련 제품을 다양하게 개발하고 있다. 일본에서의 시장 규모는 80억엔 이상이며(2001년 기준) 매년 시장규모가 큰 폭으로 성장하고 있다. 미국에서도 카테킨의 항산화 기능에 대한 관심이 높아 EGCg 함량이 높은 카테킨 제품에 대한 인기가 높다. 카테킨은 향후에도 건강 증진이나 고령화 사회에 대응할 식품 및 의약품으로 개발이 확대되며 또한 환경파괴를 방어하기 위한 환경 연관 산업에도 주목을 받을 것으로 기대되어 크게 성장할 것으로 보인다.

따라서 본 과제에서는 EGCg 고함유 카테킨 및 무카페인 카테킨 제조를 위한 카테킨 정제방법 확립 및 이들 조카테킨을 이용한 여러 가지 카테킨 함유 가공제품을 개발하고자 하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 카테킨의 최적 추출조건 선정

카테킨의 최적 추출조건을 확립하기 위한 용매 선정 및 선정된 용매의 최적 추출농도결정 실험은 Folin-Ciocalteu assay에 의한 총폴리페놀 함량 측정에 의하여 실험하였다. 즉, Fig. 5와 같이 각각의 추출물 0.1 mL에 증류수 6 mL, Folin-Ciocalteu 시약 0.5 mL를 가하여 혼합하고 8분 후에 15% Na_2CO_3 2 mL를 가한 후 10 mL로 정용하였다. 그런 다음 실온에서 2시간 방치 후에 765 nm에서 흡광도를 측정하여 gallic acid로 환산하여 정량하였다.

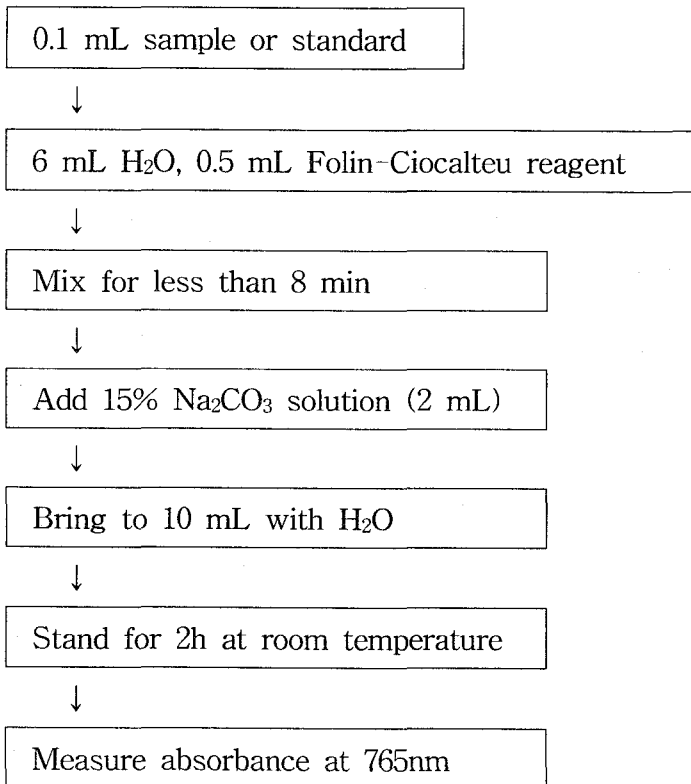


Fig. 5. Procedure of Folin-Ciocalteu assay for total phenolic content.

2. 카테킨의 최적 정제조건 선정

녹차 추출물 중의 카페인 제거를 위해 chloroform이나 methylene chloride를 사용하여 용매분획을 행하였으며, 카테킨 분리를 위해 ethyl acetate로 용매분획 후 40℃ 온도에서 진공농축하여 용매를 완전히 제거하였다. 그런 다음 소량의 물을 첨가하여 건조 후 수율 및 조카테킨의 조성을 조사하였다.

3. 녹차기능성 성분을 이용한 제품개발

가. 가용성 고형분 함량

가용성 고형분 함량은 digital refractometer(PR-100, ATAGO Co., Japan)를 사용하여 ° brix로 나타냈다.

나. pH 측정

pH는 pH meter(HANNA HI9321, Singapore)를 사용하여 측정하였다.

다. 기호도 조사

숙취해소 음료의 최적 배합비 설정을 위해 연구원 직원을 대상으로 평가항목을 맛, 색, 냄새, 종합적 기호도로 구분하여 강도법이나 순위법 등으로 평가하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 카테킨의 최적 추출조건 선정

카테킨의 최적 추출 조건을 확립하기 위해 분쇄한 녹차엽에 각각의 용매를 처리하여 추출시험을 행하였다. 녹차는 폴리페놀의 대부분이 flavanols 즉 catechins으로 구성되어 있으며 각 용매별로 추출된 총폴리

페놀의 함량은 Table 28에 나타낸 바와 같이 50% CH₃CN 처리구에서 가장 높았으나 조카테킨 분리, 정제를 위한 작업 용이성을 고려하여 CH₃CN 다음으로 추출 수율이 높은 에탄올을 추출용매로 선정하였다. 에탄올 농도 별로 녹차를 추출하여 총폴리페놀 함량을 측정한 결과는 Table 29에서 보는바와 같이 40~60%의 농도로 추출하는 것이 카테킨 추출에 가장 효과적인 것으로 나타났다.

Table 28. Total polyphenol content of green tea extracts by different extracting conditions

	Total polyphenol content(mg/g)
50% CH ₃ CN	139
50% MeOH	123
50% EtOH	130
80°C Hot water	106

Table 29. Total polyphenol content of ethanol extracts at various concentrations

	Total polyphenol content(mg/g)
20% EtOH	110
40% EtOH	130
50% EtOH	130
60% EtOH	128
80% EtOH	87
100% EtOH	6

2. 카테킨 정제방법에 따른 카테킨 함량

2. 카테킨 정제방법에 따른 카테킨 함량

가. 정제 방법 1

분말 녹차엽 50g을 사용하여 Fig. 6의 방법으로 ethyl acetate 및 물을 사용하여 조카테킨을 분리, 정제 후 2.103 g의 조카테킨을 얻었다. 조카테킨을 50% CH₃CN을 이용하여 mg/mL 수준으로 용해 후 10배 희석하여 HPLC를 행한 결과 Table 31에 나타낸 바와 같이 총카테킨 함량은 964.16 mg/g이 함유되어 있어 96% 이상이 카테킨으로 구성되어 있음을 알 수 있었다. 카페인은 101.80 mg/g이 함유되어 있어 시판 조카테킨 보다 약간 더 많이 함유되어 있었다.

Table 30. Yield of crude catechins treated with various conditions

Yield of crude catechins	
Method 1	4.2%
Method 2	4.1%
Method 3	2.0%

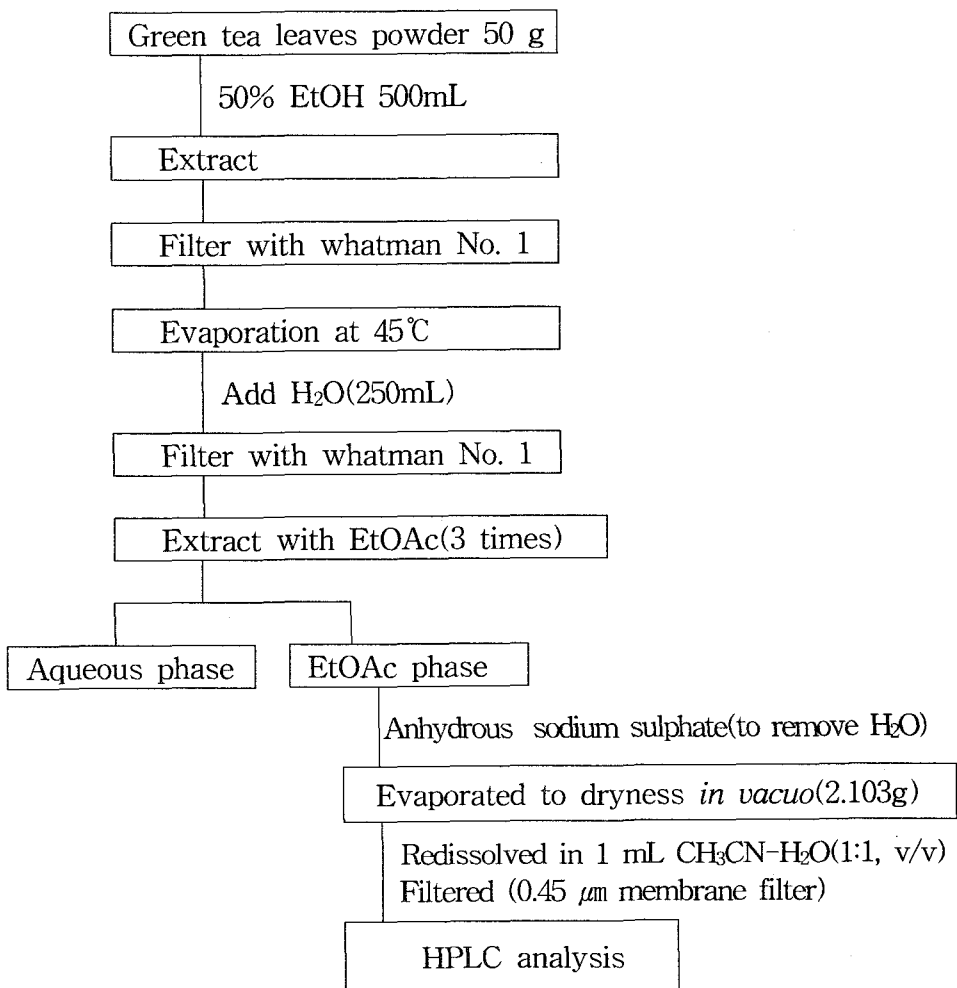


Fig. 6. Purification procedure of crude catechins.

Table 31. Composition of crude catechins treated with various conditions

	Contents(mg/g of crude catechins)				
	Method 1	Method 2	Method 3	Product A	Product B
GC	13.95	72.55	-	13.06	16.73
EGC	474.62	369.96	3.47	107.52	211.63
C	1.52	14.44	0.24	10.05	8.37
EC	39.85	42.66	16.11	33.18	40.44
EGCg	329.26	312.86	584.35	109.73	401.29
GCg	0.30	28.95	1.43	2.19	8.98
ECg	104.66	110.84	273.85	143.33	199.59
Cg	-	-	-	-	-
Total catechin	964.16	952.26	879.45	419.06	887.03
Caffeine	101.80	50.16	-	77.78	96.22

나. 정제 방법 2

분말 녹차엽 50 g을 사용하여 Fig. 7의 방법으로 chloroform 및 ethyl acetate를 사용하여 조카테킨을 분리, 정제 후 2.05g의 조카테킨을 얻었다. 조카테킨을 50% CH₃CN을 이용하여 mg/mL 수준으로 용해 후 10배 희석하여 HPLC를 행한 결과 Table 31에 나타낸 바와 같이 총카테킨 함량은 조카테킨 1g당 952.26 mg이 함유되어 있어 95% 이상이 카테킨으로 구성되어 있음을 알 수 있었다. 카페인 50.16 mg/g이 함유되어 있어 시판 조카테킨 보다 더 적게 함유되어 있음을 알 수 있었다.

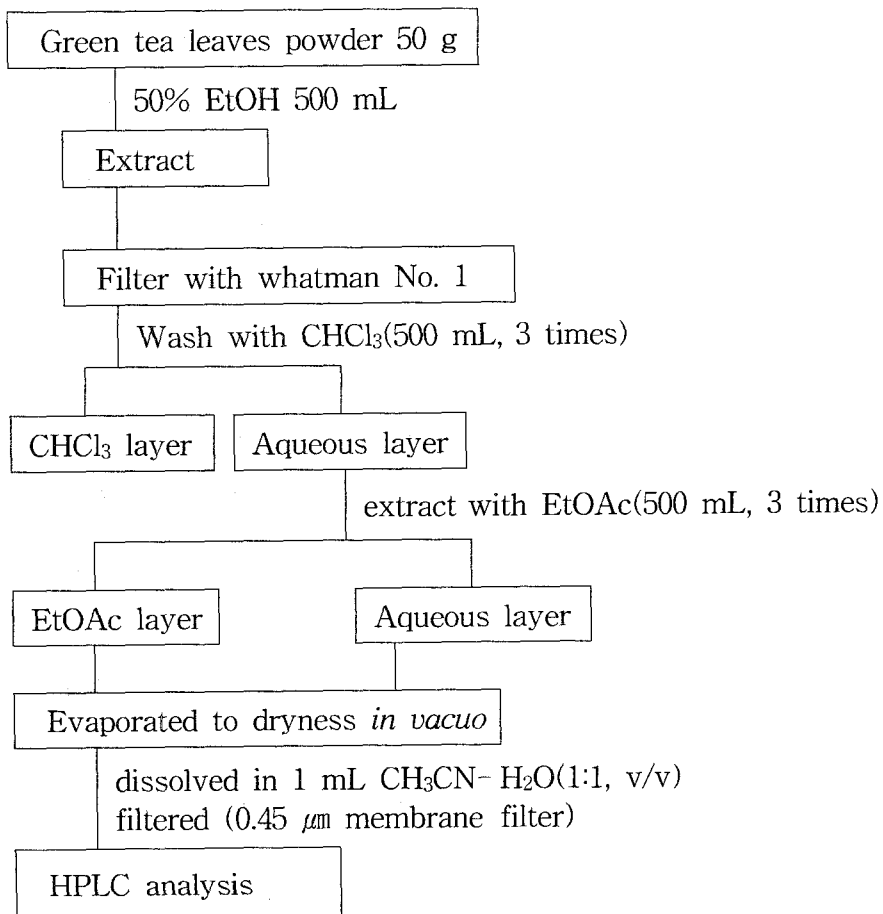


Fig. 7. Purification procedure of crude catechins.

3) 정제 방법 3

분말 녹차엽 50 g을 사용하여 Fig. 8의 방법으로 methylene chloride 및 ethyl acetate를 사용하여 조카테킨을 분리, 정제 후 1.001 g의 조카테킨을 얻었다. 조카테킨을 50% CH₃CN을 이용하여 mg/mL 수준으로 용해 후 10배 희석 하여 HPLC를 행한 결과 Table 31에 나타낸 바와 같이 총카테킨 함량은 879.45 mg/g이 함유되어 있어 다른 정제 방법에 비해 수율 및 순도가 다소 떨어지는 반면 각종 생리활성 효과가 우수한 것으로 알려진 EGCg 함량이 전체 카테킨의 66.4%로 매우 높은 수준을 함유하고 있었으며 카페인 전혀 검출되지 않아 카페인 함량이 적으면서 생리활성이 우수한 조카테킨을 얻는 방법으로 가장 효과적이었다.

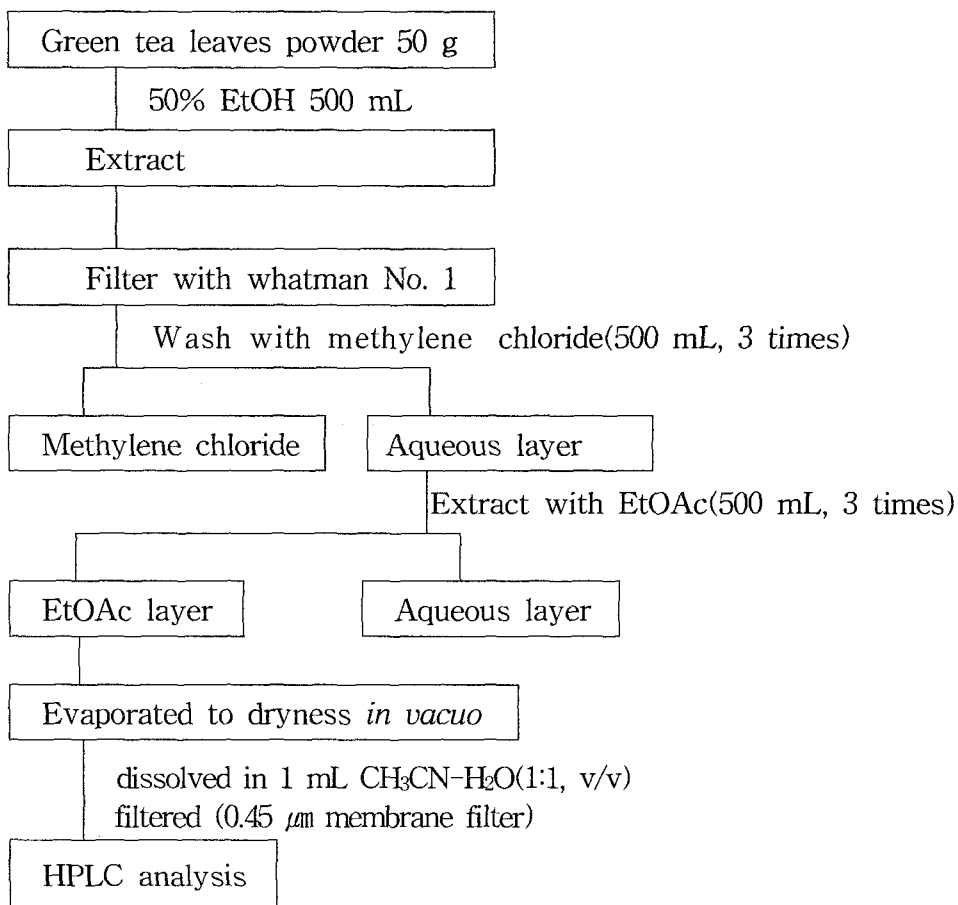


Fig. 8. Purification procedure of crude catechins.

3. 표준품을 사용한 카페인 및 카테킨 회수율 조사

카페인 제거에 가장 효율적인 methylene chloride 및 카테킨 회수에 가장 효율적인 ethyl acetate를 사용한 카테킨 정제방법(Fig. 8)을 기본으로 하여 카페인 표준품과 카테킨 중 생리활성 효과가 우수한 EGCg 표준품을 가지고서 Fig. 9 및 Fig. 10과 같이 전처리하여 각 성분의 잔존률을 조사하였다. 그 결과 Table 32에 나타낸바와 같이 Fig. 9의 방법으로 전처리시 카페인은 peak area가 7,192,054에서 22,351로 감소되어 0.3%만이 잔존되어 카페인의 대부분이 제거되었음을 알 수 있었고 EGCg는 peak area가 11,261,551에서 5,751,702로 전처리 후 51.1%가 잔존해 있었다. 또한 전처리 과정에서 epimerization이 일어나 EGCg의 epimer인 GCg가 새롭게 생성되었다. Fig. 10과 같이 각 용매분획 단계에서 pH를 조절하여 pH의 영향을 살펴본 결과 카페인 은 완전히 제거되어 검출되지 않았으나 EGCg는 16.8%만을 회수할 수 있었다.

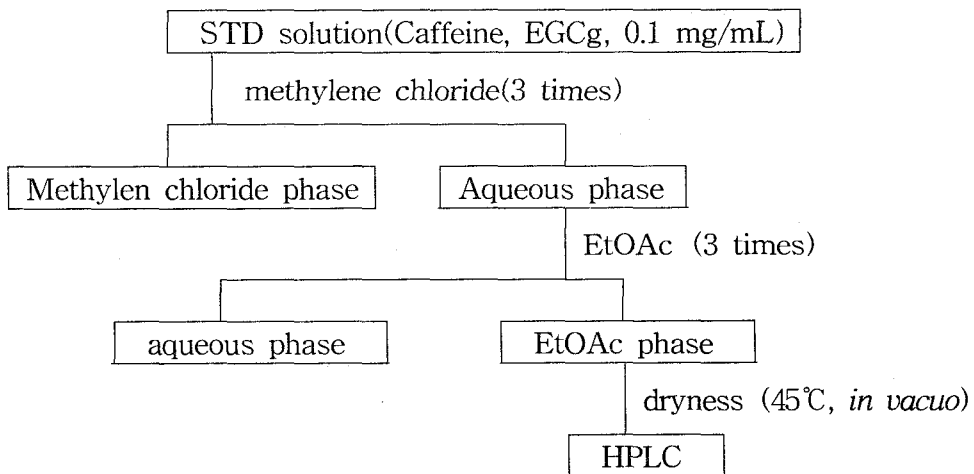


Fig. 9. Purification procedure of crude catechins.

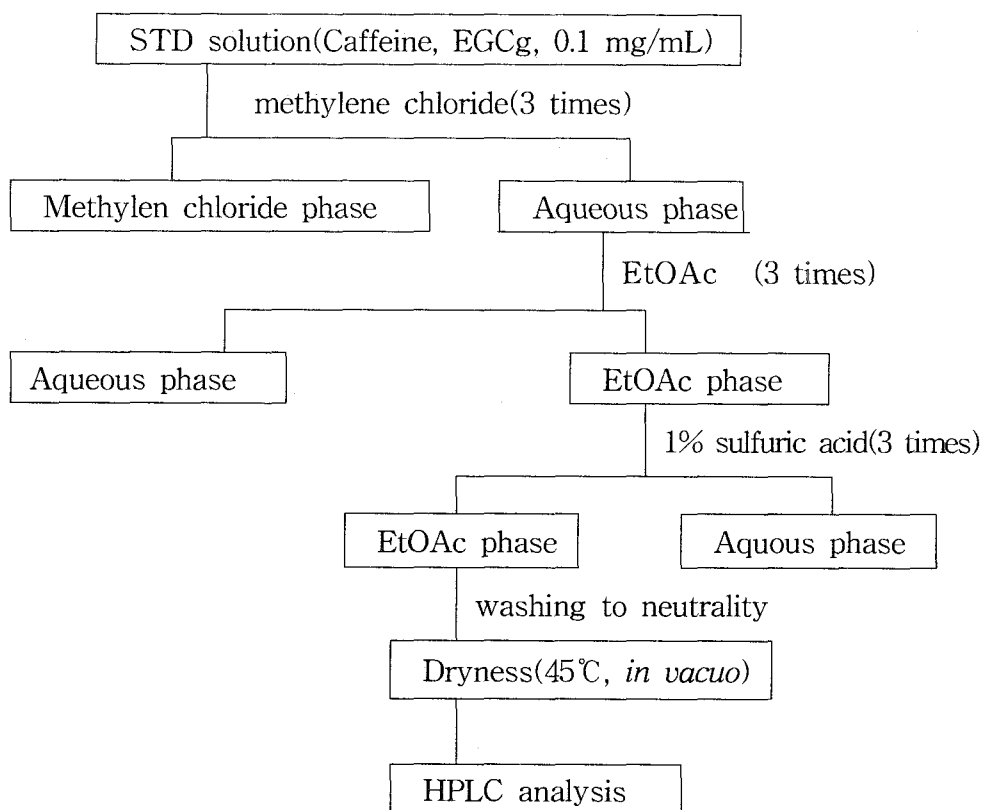


Fig. 10. Purification procedure of crude catechins.

Table 32. Change of caffeine and catechins in standard solution during purification procedure

	Peak area		
	Caffeine	EGCg	GCg
Original ¹⁾ peak area	7,192,054	11,261,551	-
Fig. 8 method	22,351	5,751,702	160,519
Fig. 9 method	-	1,886,634	104,979

1) Originally, fresh standard solutions containing 0.1 mg caffeine/mL and 0.1 mg EGCg/mL.

4. 숙취해소 음료 제조

가. 생약류의 최적 추출조건 확립

숙취해소 효과가 있는 각각의 생약류에 대하여 물을 추출용매로 하여 각 생약류의 최적 추출조건을 설정하였다. 즉, 갈근, 초석잠, 홍삼, 영지, 복분자, 오미자 등 각각의 생약재와 물을 1:100(w/w)의 비율로 혼합하여 100℃에서 환류냉각하면서 추출시간에 대한 가용성 고형분의 추출 수율을 조사하였다. 그 결과 Table 33에 나타낸 바와 같이 효율적인 추출을 위한 추출시간은 2~3시간인 것으로 판단되었다.

Table 33. 각 생약재의 추출시간별 가용성 고형분 함량의 변화

추출시간 (min)	가용성고형분 함량(° Brix)					
	갈근	초석잠	홍삼	복분자	영지	오미자
30	0.6	0.7	0.5	0.4	0.2	0.4
60	0.7	0.7	0.5	0.5	0.2	0.4
90	0.8	0.7	0.6	0.5	0.3	0.5
120	0.8	0.8	0.6	0.5	0.3	0.5
150	0.9	0.8	0.6	0.6	0.3	0.5
180	1.0	0.8	0.6	0.6	0.3	0.5

나. 녹차와 생약재를 이용한 숙취해소 음료 제조

녹차와 생약재를 이용한 음료는 기 보고된 생약재의 숙취해소능을 참고로 하여 시제품을 제조하였으며, 제조된 음료에 대한 기호도 조사를 실시하여 보완점을 개선시켜 가면서 최종적인 제품을 제조하였다.

1) 녹차추출분말 제조

녹차추출 분말의 제조공정은 Fig. 11에 나타낸 바와 같이 녹차를 열수 추출 후 농축하여 동결건조하여 사용하였다.

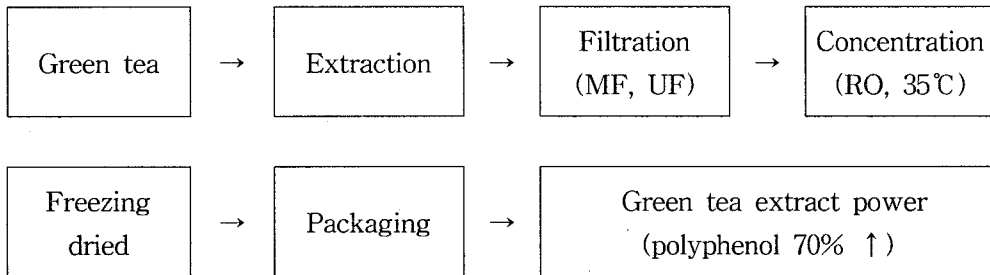


Fig. 11. The processing of green tea extract powder.

2) 음료의 제조

(1) 녹차와 생약재의 배합비 결정

생약재를 Table 34의 혼합비율로 100℃에서 3시간 침출 후 여과한 여액을 100 mL로 정용 후 녹차 추출 분말과의 혼합비율을 Table 35에 나타낸 배합비율에 따라 혼합 후 제조하여 기호도 조사를 실시하였다. 이때 당도는 고과당으로, pH는 구연산으로 조절하여 사용하였으며, 기호도 조사 결과 한약재의 특유한 맛과 신맛이 잘 어울리는 C 처리구 음료가 가장 좋은 것으로 조사되었다.

Table 34. 생약재 추출비율

갈 근	1.0%
초석잠	1.0%
홍 삼	0.5%
복분자	0.5%
영 지	0.8%
오미자	1.0%

Table 35. 녹차와 생약재 추출물 배합비

	A 처리구	B 처리구	C 처리구
녹차 추출분말(%)	0.1	0.1	0.2
한약재 추출물(%)	50	100	100
당도(° brix)	17	17	17
pH	3.5	3.5	3.5
종합적 기호도 ¹⁾	6.3±1.2	5.8±1.0	6.8±0.5

1) 평균±표준편차, 관능요원 30명

(2) 숙취해소 음료의 제조

기호도가 좋은 것으로 나타난 B 처리구 음료를 기본으로 비타민류, 꿀, 설탕, 고과당, 사과 농축액 등의 사용량을 조절하면서 음료를 제조하는 실험을 반복하였다. 그 결과 Table 36과 같이 2가지 음료로 압축되었으며 이 중 사과의 깨끗한 맛과 한약재의 향이 잘 어우러진 E 처리구 음료가 가장 선호도가 좋은 것으로 나타났다.

Table 36. 숙취해소 음료 최적 배합비

원재료명	배합비(%)	
	D 처리구	E 처리구
녹차 추출 분말	0.2	0.2
한약재 추출물	100	100
Vitamin 류	0.004	0.004
액상과당	12.0	12.0
꿀	6.5	3.5
설탕	-	3.0
구연산	0.15	0.15
사과 농축액	-	2
배 농축액	2	-
종합적 기호도	6.5±1.1	7.0±1.2

1) 평균±표준편차, 관능요원 25명

(3) 숙취해소음료의 제조공정도

숙취해소 음료 제조를 위한 공정도는 Fig. 12에 나타낸 바와 같다.

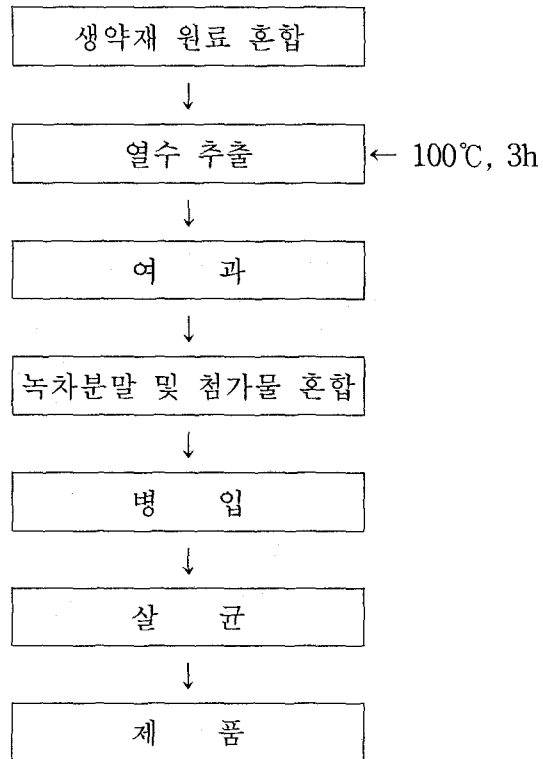


Fig. 12. 숙취해소 음료 제조공정도.



Fig. 13. 음료 시제품 사진

5. 녹차성분 이용 정제(Tablet) 제품

타정 제품은 재료에 따라 압력을 잘 받는 것이 있고 적절한 양의 수분이 있어야 타정이 잘되며 압력이 높고 입자가 작을수록 잘되고 또한 최종제품의 외관도 매끄럽다. 타정이 잘 안되는 재료에는 binder를 사용하는데 전분풀이나 찹쌀풀을 입히거나 덱스트로스, CMC 등을 사용한다. 타정 후에는 수분함량이 5% 이하여야 유통 중 미생물 문제가 없다. 또한 Binder 함량이 높으면 좋은 제품이 생산되지만 원재료 함량이 낮아지는 문제점이 있다. 정제제품은 타정 후 흡습의 문제, 유통 중 흔들리면서 자그마한 조각 또는 분말상태로 떨어져 나가는 문제가 있을 수 있고 변색, 산화 등으로 인한 품질열화가 일어날 수도 있다. 그리고 필요에 따라 coating하여 보통의 속용성 이외에 장용성, 지속성 등의 기능을 부여할 수 있고 고미, 냄새, 자극에 대한 masking을 기할 수 있다.

가. 정제제품의 배합비

본 과제에서 정제제품 제조에는 숙취해소 효과 등 여러 가지 약리효능이 우수한 녹차 추출분말과 숙취해소능이 있는 생약재 그리고 간의 대사기능, 배설기능 및 해독기능이 있는 필수아미노산류를 이용하여 숙취해소능이 뛰어난 정제제품을 제조하고자 하였다.

타정을 하기 위해서 1차적으로 녹차는 열수 추출하여 얻은 분말을 사용하였으며 binder는 셀룰로오스나 Na-CMC를 사용하였으며 정제제조를 위한 각 성분의 배합비는 Table 37과 같다.

Table 37. 숙취해소를 위한 정제형 제품¹⁾ 배합비

원재료명	배합비(%)	기 타
녹차추출 분말	30	카테킨 10-55% 함유
실크펩타이드	1.1	
홍삼 추출물	10	
말톨	6.0	
비타민 E 초산에스테르	5.0	
니코틴산 아미드	5.0	
염산 차아민	0.2	
리보플라빈	0.2	
비타민 C	5.0	
빵효모 추출물	35	
카르복실메탄 셀룰로오스 칼슘	0.5	
카르복실메탄 셀룰로오스 나트륨	0.5	
스테아리산 마그네슘	1.5	

¹⁾ 1정당 500mg씩 함유

나. 정제제품의 제조공정도

녹차를 이용한 숙취해소능이 있는 정제제품의 제조공정도는 Fig. 14에 나타낸 바와 같다.

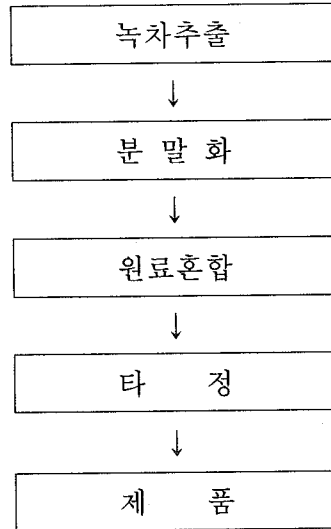


Fig. 14. 정제제품의 제조공정도

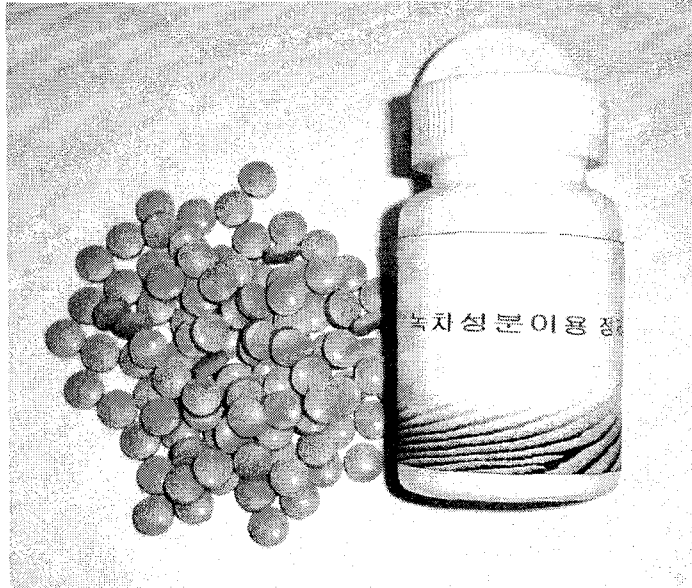


Fig. 15. 녹차성분 이용 정제 시제품 사진

6. 녹차성분 이용 캡셀 제조

캡셀의 역사는 프랑스인 Mothes와 Dublance가 젤라틴 캡셀을 발명하여 널리 알려지게 되었으며 우리나라에서는 캡셀류의 정의에 따라 건강보조식품, 특수영양식품 및 인삼·홍삼제품을 장기 보존할 목적으로 충전하여 그대로 식용할 수 있도록 하는 것을 말한다고 되어 있다. 캡셀제는 내용물을 캡셀에 충전한 경질 캡셀제와 부드러운 젤라틴막으로 성형한 연질 캡셀제가 있으며 본 과제에서는 녹차추출분말이 캡셀에 충전이 용이하며 원가면에서 유리한 경질 캡셀을 사용하고자 하였다.

가. 캡셀의 원료

경질 캡셀을 제조하는 주원료는 젤라틴으로 산으로 처리한 A type과 알칼리 처리한 B type이 있으며 충전되는 물질의 특성과 경제적인 면을 고려하여 젤라틴 type을 선택한다. 색소는 캡셀에 미려한 형태 및 색상을 나타내고 캡셀을 구분할 수 있게 만들어 주는데 본 실험에서는 식품첨가물 공전에 수재되어 있는 청색 1호, 적색 40호 및 황색 5호를 사용하였으며, 캡셀 피막에 불투명화제로 산화 티타늄을 사용하여 빛을 차단시켰다.

나. 캡셀제제의 검토

녹차성분 이용 숙취해소를 위한 경질 캡셀 제조를 위한 각 성분의 배합비는 Table 38과 같으며 이들을 각각 칭량하여 혼합하고 1 캡셀 400 mg 기준으로 충전하였다. 이때 캡셀 크기는 겉보기 밀도(bulk density)와 Tap density, 충전물의 압축성, 점착성, 퍼짐성 및 Disc 유입성 등을 평가하여 결정하였다. 캡셀 크기는 4호, 3호, 2호, 1호, 0호, 00호가 있으며 국내에서 주로 사용되는 1호, 0호, 00호의 규격은 Table 39에 나타낸 바와 같다.

Table 38. 숙취 해소를 위한 캡셀 제품의 배합비

원재료명	배합비(%)	기타
녹차 추출 분말	40	카테킨 10~55% 함유
녹차 분말	25	
갈근 추출 분말	10	
결명자 추출 분말	10	
키토올리고당	10	
비타민 등	5	

Table 39. 캡셀의 규격

캡셀 크기	캡셀 외경(mm)		캡셀 Volume(mL)		캡셀중량(mg)
	Cap	Body	Cap	Body	
00호	8.52	8.16	0.15	0.95	125
0호	7.64	7.33	0.11	0.68	97
1호	6.91	6.63	0.08	0.47	77

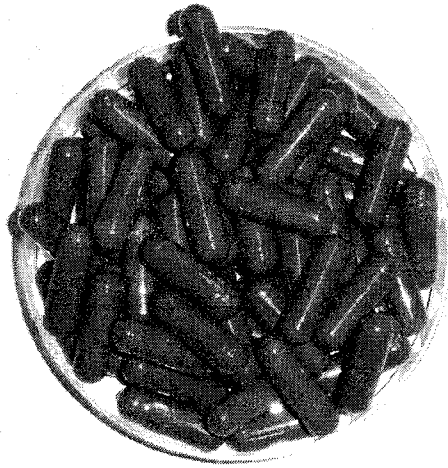


Fig. 16. 녹차성분 이용 경질 캡셀 시제품 사진

여 백

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구 분	연구목표 및 평가의 착안점	연구개발 목표의 달성도 (%)	관련분야 발전에의 기여도
1차년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> · 우리나라 녹차의 산지별, 채엽시기별 성분분석 · 항산화 효과 검색 및 비교 · ADH 활성에 미치는 효과 비교 · 카테킨의 추출 및 정제기술 개발 · 알콜 해독 및 간기능 보호 효능 비교 · in vivo 측정으로 숙취해소 식물체의 선정 	<p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p>	매우 큼
2차년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> · ACE 저해활성 비교 · 구강 미생물에 대한 항균효과 · 카테킨 등 녹차성분 이용 정제 및 캡슐제품 개발 · 녹차를 이용한 숙취해소제 개발 · 숙취해소 음료의 숙취해소능 검정 	<p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p>	매우 큼
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> · 연구개발 결과의 적정성 · 기술개발에 의한 국내 녹차산업 발전에 대한 기여도 · 연구개발 결과의 실용화 가능성 	<p>100</p> <p>100</p> <p>100</p>	매우 큼

여 백

제5장 연구개발 결과의 활용계획

1. 본 연구에서 탐색된 우리녹차의 기능성 인자는 학회발표 등을 통한 홍보로 우리녹차가 비교우위를 점할 수 있도록 유도
2. 녹차이용 각종 제품 및 숙취해소제는 즉시 기술전수하여 일본이나 미주지역의 기능성 및 건강보조식품 시장을 공략토록 함
3. 채엽시기별 녹차성분을 비교하여 목적하는 유효성분이 많이 산출되는 시점을 결정하고 차생산 농가에서 생산에 적극 활용토록 유도
4. 특허출원: 알콜성 지방간 예방 및 숙취해소효과가 있는 물질 및 그 제조방법

여 백

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 화산재의 광물질을 이용한 숙취제거, BBC News, 20020716
2. Foods and medicine preventive/improving to sickness from drinking and hangover, JP0104961, 20020410
3. Medicinal composition, JP0104984, 20020410
4. New iso flavonoid compound and hangover-proofing agent containing the same, JP2000007694, 20000111
5. Additional liquid for alcoholic drink, JP0253125. 19990921
6. Alcohol absorption metabolism regulator, JP2001226277, 20010821
7. Prophylactic and ameliorating composition for nasty aftereffect and hangover, JP2001081036, 20010327
8. Apparatus for aging alcohol, JP2001078746, 20010327
9. Pharmacological composition , JP2001026547, 20010130
10. Food and medicine having preventing effects for drunken sickness and hangover, JP2000004831, 20000111
11. Composition for preventing and treating hangover, JP0158183, 19980616
12. Preparation of heated ashitaba tea, JP0009931, 19970114
13. Container with silk powder, JP0207967, 19960813
14. Agent for promoting metabolism of alcohol in body and its production, JP0169831, 19960702

여 백

제7장 참고문헌

1. 池ヶ谷賢次郎, 高柳博次, 阿南豊正: 茶の分析法. 茶業研究報告, 71, 43-74 (1990)
2. 오미정, 홍병희: 한국산 녹차의 채엽시기 및 제조법에 따른 화학성분 변이, *Korean J. Corp Sci.*, 40(4), 518-524 (1995)
3. 오미정, 홍병희: 채엽시기 및 제조법에 따른 한국산 녹차의 펙틴, 카테킨, 카페인 함량 변이, *Korean J. Corp Sci.*, 40(6), 775-781 (1995)
4. 위지향, 문제학, 박근형: 국내산 다엽의 채취시기별 카테킨의 함량 및 조성, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 31(1), 20-23 (1999)
5. Hasselo, H.N.: *Tea Q.*, 36, 122 (1965)
6. 김종태: 茶의 科學과 文化, 保林社 (1996)
7. Yoshioka, H., Sugiura, K., Kawahara, R., Hujita, T., Makino, M., Kamiya, M and Tsuyumu, S.: Formation of radicals and chemiluminescence during the autoxidation of the catechins. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2717-2723 (1991)
8. Vermeirssen, V., Camp, J. V., Verstraete, W.: Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 51, 75-87 (2002)
9. 中林敏郎, 伊奈和夫, 坂田完三: 綠茶, 紅茶, 烏龍茶の化學と機能. 弘學出版 (1994)
10. 村松敬一郎: 茶の科學. 朝倉書店 (1991)
11. Kim E., and Na K. J. (1990) *Arch. Toxicol.* 64:644
12. Kim E., and Na K. J. (1991) *Arch. Toxicol.* 65:537

13. Kim E., and Na K. J. (1991) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 110:251
14. Konno C., Murakami M., Oshima Y. and Hikino H. (1985) *J. Ethnopharmacol.* 14:69
15. Konno C., Sugiyama M., Kano M., Takahashi M., and Hikino H. (1984) *Planta Medica* 50:434
16. Olefsky J. M. (1988) in *Cecil Textbook of Medicine* (Wyngaarden J. B., and Smith L. H. eds) p. 1360, W. B. Saunders Co. Philadelphia
17. Simopaulcus A. P. (1991) *Am. J. Clin. Nutr.* 54:438
18. Tomlinson K. C., Gardiner G. M., Hebden A., and Bennett T. (1990) *Pharmacol. Rev.* 44:103
19. Di Luzio N. R. (1965) *Life Sci.* (1965) 4:1373-1382
20. Di Luzio N. R. (1966) *Am. J. Pharm. Sci. Support Public Health* 15:50-63
21. Di Luzio N. R. (1966) *Am. J. Pathol.* 48:535-545
22. Iseri O. A., Lieber C. S., Gottlieb L. S. (1966) *Am. J. Pathol.* 48:535-545
23. Mirone L. (1966) *Am. J. Physiol.* (1966) 210:390-394
24. Vincenzi L., Meldolesi J., Morini M. T., Bassan P. (1967) *Biochem. Pharmacol.* 16:2431-2
25. US Patent 5,702,747: Proces for decaffeinating aqueous caffeine-containing extracts
26. 김광옥, 김상숙, 성내경, 이영춘: 관능검사 방법 및 응용. 신광출판사 (1993)

27. Macaee R., Robinson, R.K. and Sadler, M.T.: Encyclopedia of food science technology and nutrition, Academic Press, New York, 4, p2176 (1993)
28. Mark J. Kontny and Carol A. Mulski: Gelatin capsule brittleness as a function of relative humidity at room temperature. International Journal of Pharmaceutics, 54, 79-85 (1989)
29. 한국식품공업협회: 식품공전 (2001)