

## 녹차를 이용한 GABA Tea 개발

주관연구기관	제주관광대학
연구책임자	김정현
발행년월	2008-01
주관부처	중소기업청
사업관리기관	중소기업기술정보진흥원
NDSL URL	<a href="http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO201100009892">http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO201100009892</a>
IP/ID	14.49.138.138
이용시간	2017/11/03 16:41:27

### 저작권 안내

- ① NDSL에서 제공하는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, KISTI는 복제/배포/전송권을 확보하고 있습니다.
- ② NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 상업적 및 기타 영리목적으로 복제/배포/전송할 경우 사전에 KISTI의 허락을 받아야 합니다.
- ③ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 보도, 비평, 교육, 연구 등을 위하여 정당한 범위 안에서 공정한 관행에 합치되게 인용할 수 있습니다.
- ④ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 무단 복제, 전송, 배포 기타 저작권법에 위반되는 방법으로 이용할 경우 저작권법 제136조에 따라 5년 이하의 징역 또는 5천만 원 이하의 벌금에 처해질 수 있습니다.

# 녹차를 이용한 GABA Tea 개발 최종보고서

과제책임자 : 제주관광대학 김 정 현

# 목 차

## 제 1 장 서론

## 제 2 장 과제개발 내용 및 방법

### 제 1 절 녹차의 GABA 혐기처리 제조장치 개발

1. GABA 녹차 제조장치의 기본 요건
2. 장치의 기술적 특성

### 제 2 절 GABA tea 제조 및 성분 분석

1. 실험 재료
2. 실험 방법
  - 1) 차의 혐기처리
  - 2) 차의 제조
  - 3) 시료의 제조
  - 4) 아미노산 및 GABA 함량 분석
  - 5) 지방산 및 유기산 분석
  - 6)  $\beta$ -Sitosterol 분석
  - 7) 폴리페놀 성분 분석

### 제 3 절 항산화 활성 분석

1. 실험재료
2. 전자공여능(Electron Donating Abilites, EDA) 측정
3. Nitric oxide 소거 활성 측정
4. Xanthine Oxidase 억제
5. Superoxide 소거능 측정

## 제 3 장 사업성과

### 제 1 절 충전 장치에 대한 layout 및 충전기 사양

1. 충전기 주변 장치
2. 충전기 본체

### 제 2 절 GABA tea 제조 및 성분 분석 결과

1. 아미노산 및 GABA 함량 분석
2. 지방산 및 유기산 분석
3.  $\beta$ -Sitosterol 분석
4. 폴리페놀 분석(Polyphenol analysis)

### 제 3 절 항산화 활성 분석

### 제 4 절 시제품사진

## 제 4 장. 결론

## 제 1 장 서론

- 녹차는 오래전부터 가정이나 직장에서 음용하여 왔다. 녹차의 효능이 밝혀지면서 녹차를 상품화하고자 하는 시도가 이루어져 엽상, 지함, 캔 등의 녹차 제품이 상품화되고 있으며, 최근에는 분말을 이용한 녹차 라떼와 같은 다양한 제품이 출시되고 있다. 녹차는 일반식물성분에 비해서 카페인, 데아닌을 함유하며 폴리페놀류, 비타민 C의 함유량이 높고, 무기성분으로 칼륨, 망간, 불소 등을 다량으로 함유하는 특징이 있다. 이들 녹차 고유의 성분들에 의한 항산화, 항암, 강심, 수렴, 항당뇨, 항돌연변이, 혈당상승억제, 면역능력저하억제, 혈중콜레스테롤 저하, 이노축진, 항알레르기, 항균, 충치예방 및 구취제거작용 등의 여러 가지 약리적 효능이 계속적으로 밝혀지고 있다. 건강지향적인 소비자들이 관심이 고조되고 삶의 질을 높여주는 차문화에 대한 관심이 새롭게 인식되고 있다.
- 녹차가 함유하고 있는 20~30%의 수용성 성분중 카테킨, 카페인 등의 성분이 규명되었고, 또한 감마-아미노부티르산( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)이 포함되어 있다. GABA는 동·식물계에 널리 분포되어 있는 비단백질구성 아미노산으로 고등동물에 있어서는 신경의 중요한 억제 전달물질이며 혈압강화작용을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, 사람에 있어서는 신경계, 혈액에 함유되어 있고, 이의 대부분은 뇌의 골수에 존재하여 아세틸콜린이라고 하는 신경전달 물질을 증가시키고, 뇌기능을 촉진시키는 등의 생리작용을 한다는 것이 알려졌다. 이에 찾잎 중에 감마-아미노부티르산의 함량을 증가시키고자 하는 노력이 지속되어 왔다.
- 녹차는 비발효차로 제다과정중 폴리페놀의 산화정도가 약하여 소량의 담황색의 산화물이 있어 제다 방법에 따라 탕색은 녹황색 또는 황록색을 띤다. 녹차는 주로 살청(Fixation)과 유념(Rolling)를 시켜서 완성시키며 근래의 녹차는 제다 방법, 또는 형태에 따라, 원료인 잎의 상태에 따라 분류된다.
- $\gamma$ -aminobutyric acid(GABA)는 4개의 carbon으로 구성된 비단백질 아미노산으로 아미노산 풀의 주요한 구성성분이다. GABA는 구조적으로 proline과 유사한 고리구조를 포함하여 용매내에서 여러 가지 형태로 존재하는 수용성 분자이며, 물리적인 pH(pK가 4.03에서 10.56)상태의 한 분자내에서 양전하와 음전하를 띠는 Zwitterion이다. 또한 GABA는 alanine과 함께 광범위하게 분포되어 있으며 혐기적인 상태에서 클로렐라, 포유동물 조직 및 식물등에 축적되는 것으로 보고되고 있다.
- GABA는 glutamic acid decarboxylase (GAD) 효소에 의해 glutamate를 카르복실 이탈반응

에 의해 합성되는 중추신경계(mammalian central nervous system (CNS))에서 억제 신경전달물질로서 심장혈관 기능, 혈압상승억제 등에 주요한 작용을 한다.

- 일본에서는 Tsushida, Murai, Omori, and Okamoto가 우연히 혐기적인 상태에서 녹차에 GABA가 다량 축적되는 것을 발견하고 혐기적인 상태로 축적된 녹차, 우롱차, 홍차의 GABA 함량을 조사하였다. 식물에서 GABA의 합성은 여러 외부 환경적 요인에 의해 영향을 받는 것으로 보고 있어 식품체가 여러 환경적 스트레스에 대항하기 위한 수단 중의 하나로 GABA 생성체계를 가동시키는 것으로 추정된다. 이와같은 식물체에서의 GABA 생성 기작을 이용하여 녹차잎을 혐기처리함으로써 GABA 함량이 증진된 tea가 개발되고 있다.
- 본 연구의 목적은 혐기적 상태에서 전처리 조건변화에 따른 녹차의 GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) 함량이 증진된 높은 녹차를 개발하고자 하였다.
- 기존의 GABA를 함유시킨 식품들은 빵, 발아곡류와 녹차의 GABA tea를 제조하기 위해 혐기상태인 N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>를 이용하여 감마-아미노부티르산 성분을 증대시킨 GABA차를 제조하는 방법 등이 보고되고 있다. 이에 녹차원료 물질의 수용성을 특성에 따른 분말차류의 모델을 구축하고 이를 개발하여 시제품 제조 및 공정을 통한 제품화를 이루고자 한다. 녹차에 함유되어 있는 수용성 성분인  $\gamma$ -아미노부티르산 성분이 증대된 녹차를 제조하고자 한다.
- 따라서 제주지역 녹차 및 GABA tea를 주원료로 하여 기호도가 우수한 제품 개발을 목적으로 하였으며, 이를 위하여 GABA차의 전처리 및 적정 추출조건 확립, 녹차분말 및 GABA차 분말의 성분분석, 시제품제조를 통한 제품화를 이루고자 하였다.

## 제 2 장 과제개발 내용 및 방법

### 제 1 절 녹차의 GABA 혐기처리 제조장치 개발

#### 1. GABA 녹차 제조장치의 기본 요건

- 1) 충전기 내부를 적정 질소 압력(25~30 PSI)으로 유지하며 녹차를 혐기 처리한다.
- 2) 충전기 내부는 진공상태로 보전한다.
- 3) 가열시스템으로 열전소자를 활용하여 충전기 내부를 17℃에서 30℃로 유지하며, 가열시스템에 마이콤(Micom)를 이용하여 온도 제어장치를 구성한다. 이를 이용하여 사용자가 적절한 온도제어를 할 수 있도록 시스템을 구성한다.

#### 2. 장치의 기술적 특성

- 1) 질소 가스 용기 상단부에 가스게이지 2개를 장착하여 가스 내부의 압력과 공급압력을 실시간으로 확인할 수 있도록 한다. 또한, 충전기에도 압력게이지를 부착하여 충전기 내부의 압력도 동시에 확인할 수 있도록 한다. 충전기에 부착된 압력게이지는 충전기 자체의 압력강하를 감시하는 역할을 한다. 그래서 본 장치에 부착된 압력게이지는 총 3개이다.
- 2) 충전기 내부를 진공상태로 유지하는 방법은 질소가스를 일정시간 투입하여 충전기 내부를 질소가스로 완전 대체함으로써 진공과 똑같은 상태로 만든다.
- 3) 가열시스템은 의료용 혹은 반도체 제조장치의 가열시스템으로 활용되는 열전소자를 활용하게 된다. 이는 증기를 이용한 습식 가열 시스템이 생엽의 상태를 변화 시킬 수 있기 때문에 이런 문제점을 개선하기 위함이다. 또한 열전소자는 오염물질(유해가스 외)을 배출하지 않고 온도제어가 용이하기 때문에 본 시스템에 적용하게 되었다. 온도제어장치에는 과열방지기능을 장착하여 과열로 인한 생엽의 파손을 방지하였다.

Fig. 1. 은 열전소자의 원리를 나타내는 것이고, Fig. 2. 는 열전소자의 실제모습이다. Fig. 3. 은 과열방지회로의 회로도 모습이다.

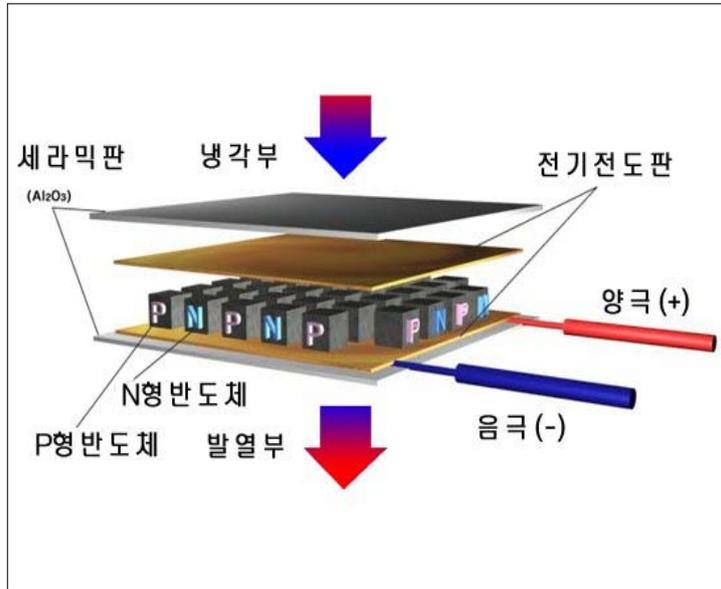


Fig. 1. 열전소자 원리.

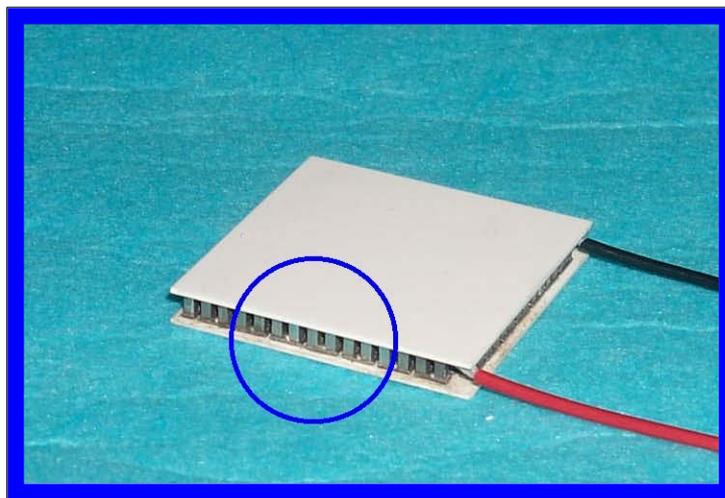


Fig. 2. 열전소자 실사.

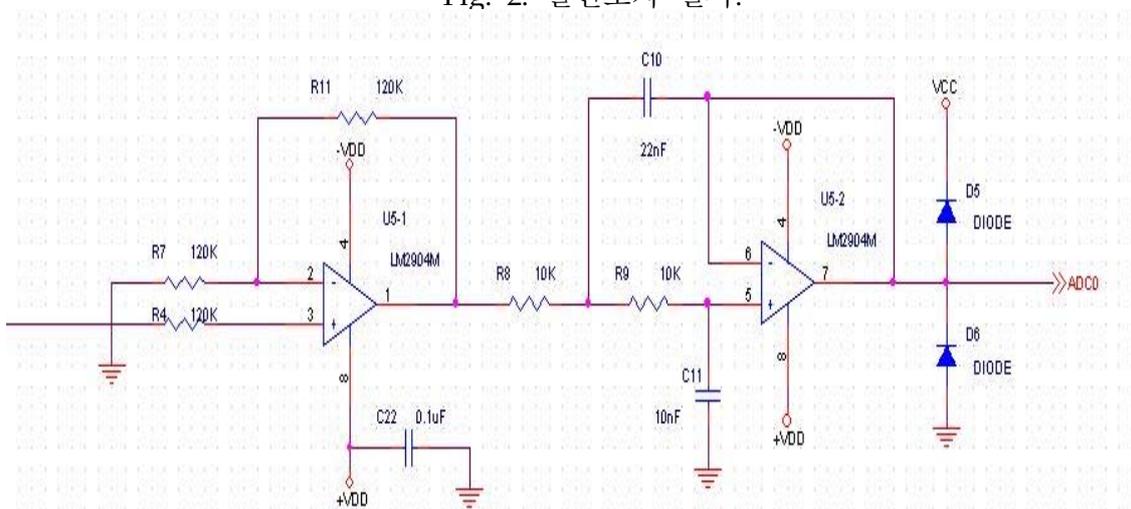


Fig. 3. 과열방지 회로도.

## 제 2 절 GABA tea 제조 및 성분 분석

### 1. 실험 재료

본 실험에 사용한 시료는 제주도 서귀포시 색달동 제주녹차영농조합법인 다원에서 재배중인 일본 품종인 야부키타(Yabukita)를 2007년 10월에 수확하여 사용하였다.

### 2. 실험 방법

#### 1) 차의 헹기처리

차잎은 공간 부피가 약 60 liter에 해당되는 GABA 헹기처리장치에 일정량씩 담고, N<sub>2</sub> 가스와 진공으로 6시간과 12시간동안 헹기처리 하였다. 이들 시료의 헹기처리 조건을 검토하기 위하여 상온(17℃)과 30℃로 조정한 반응기에 시료를 넣고 온도와 시간 변화에 따라 헹기 처리 하였다.

#### 2) 차의 제조

녹차는 Fig. 4와 같이 300℃ 무쇠솥에서 5분 뒤은 뒤 즈이 나올 때까지 비빈 다음 식혀서 2차 뒤음을 하였고, 2차 뒤음은 250℃에서 3분 뒤은 후 털어준 다음 계속하여 6번 뒤음과 털어주는 작업을 반복하였으며, 마무리는 재의 열을 이용하여 90분 동안 뒤어서 제조하였다.

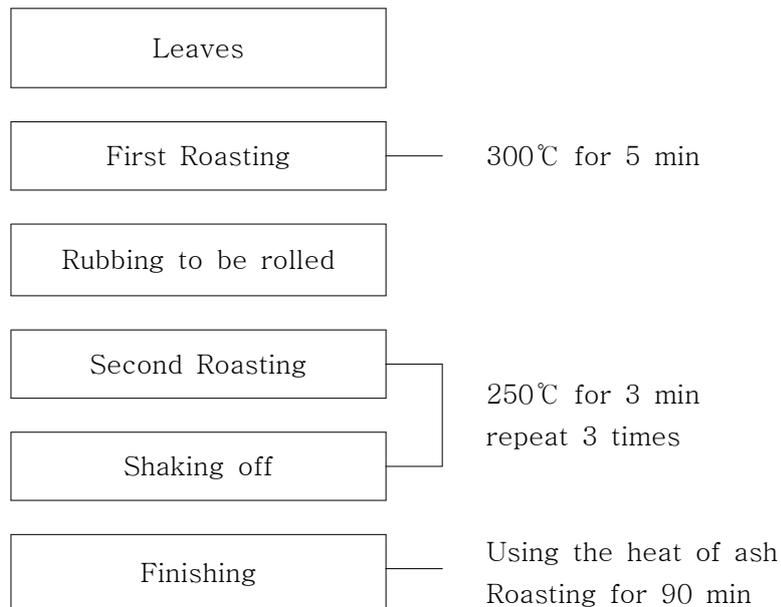


Fig. 4. Processing green tea (non-fermented tea) manufacturing

### 3) 시료의 제조

건조된 녹차잎 10g을 90℃의 D.W. 1000ml 에 가한뒤 10분후 추출하였다. 그후 여과지 (Whatman No. 2)를 이용하여 여과후 이 액을 동결건조(제이오텍, 국산)시킨후 분말상태로 준비하여 시험에 이용하였다.

### 4) 아미노산 및 GABA 함량 분석

아미노산의 분석은 "EZ:faast" GC-FID kit 를 사용하였다. 아미노산 표준품은 Fluka(Buchs, Switzerland)와 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO)를 사용하였다. 물로 추출한 녹차 추출물을 일정량 취한 후 산성상태에서 아미노 화합물을 양이온 수지에 흡착시킨다. 200 $\mu$ l of 2-propanol/water로 세척하고 알칼리용액으로 분리한 다음 유도체시약인 propyl chloroformate 을 넣어 10초간 혼합하였다. 70초간 반응시킨후 유도체를 chloroform and isooctane 혼합용매 로 추출한다음 GC에 넣어 분석하였다.

### 5) 지방산 및 유기산 분석

지방산과 유기산분석은 William. A. C and J. G.Hendel(Journal of Chromatographic Science, Vol(16), 314-317, 1978)에 따라 분석하였다. 시료 5g을 측정하여 삼각 flask에 넣는다. Internal standard로 Methanol (glutaric acid 25mg이 포함된 ISTD) 20ml을 첨가하고 12% sulfuric acid을 methanol 30ml에 첨가하여 20시간 동안 교반한 뒤 Filter paper(TOYO 5A)로 여과하여 25ml separatory funnel로 옮긴후 Chloroform 10ml로 2번 추출하였다. Chloroform 층을 모은 다음 25ml를 맞춘후 GC(Hewlett Packard GC 5890)를 이용하여 분석하였다. 분석 조건은 column(30m  $\times$  0.32 mm id  $\times$  0.2 $\mu$ m film thickness Coated with SP-2340), FID detector (230℃), Injector temp. (230℃), column oven temp.( 50℃ for 10min. 2℃/min. programmed to 230℃ for 60min.)으로 하였다.

Table 1. GC conditions for fatty acid and organic acid composition analysis

Item	Condition
Instrument	H/P5890GC
Detector	FID 230°C
Column	30m × 0.32 mm id × 0.2um film thickness Coated with SP-2340
Column Flow	7.5 psig
Column oven temp	50°C for 10min. 2°C/min. programmed to 230°C for 60min.
Injection Volume	3ul split mode Quantitative analysis
ISTD method	25mg fatty acid methyl ester standard / 25ml chloroform (ISTD 12.5mg)

6)  $\beta$ -Sitosterol 분석

$\beta$ -Sitosterol 분석은 gas chromatography (Hewlett Packard GC 5890, USA)를 이용하여 측정하였다. 분석 시료는 2g을 측정하여 삼각 flask에 넣고 Dichlormethane 50ml를 가한후 30min 동안 교반한 후 Filter paper(TOYO 5A)를 이용하여 여과한 후 25ml를 취한후 Rotatory vacuum evaporator(BUchi R101, Germany)로 감압 농축하여 Chloroform 2ml에 녹여낸 후 분석에 이용 하였다. GC 분석조건은 column(30m × 0.32 mm id × 1um film thickness Coated with SPB-5), FID detector (280°C), Injector temp. (280°C), column oven temp.(200°C for 10min. 5°C/min. programmed to 280°C for 60min.)으로 하였다.

Table 2. GC conditions for  $\beta$ -Sitosterol composition analysis

Item	Condition
Instrument	H/P 5890 GC
Detector	FID 280°C
Column	30m × 0.32 mm id × 1um film thickness Coated with SPB-5
Column Flow	15 psig
Column oven temp	200°C for 10min. 5°C/min. programmed to 280°C for 60min.
Injection Volume	2ul splitless mode

7) 폴리페놀 성분 분석

폴리페놀 성분 분석은 Xiao Rong Tang etal. (Food Chem. 100, 1132-1136 (2007))을 이용하

여 정량하였다. 시료 0.5g을 측정하여 삼각 flask에 넣고 25ml 증류를 첨가한다. 90°C water bath(Jaeil-II Chemistry, Korea)에서 30min분동안 침출시킨 후 Filter paper(TOYO 5B)로 여과하여 1ml을 취한다. 여기에 HPLC용 물 4ml를 첨가하고 Syringe filter(0.45um, Sigma, USA)로 여과하여 C-18 column(3.9 mm × 150 mm Coated with C18 Symmetry)과 UV Detector를 이용하여 230nm에서 HPLC(Waters 626, Japan)로 분석하였다.

Table 3. HPLC conditions for Polyphenolic compounds composition analysis

Item	Condition
Instrument	Waters 626
Detector	Waters 486 UV 230nm
Column	3.9 mm × 150 mm Coated with C18 Symmetry
Column Flow	1ml/min.
Mobile phase	Eluent A : 5% Acetonitrile / H <sub>2</sub> O / 0.1% Acetic Acid Eluent B : 50% Acetonitrile / H <sub>2</sub> O / 0.1% Acetic Acid
Injection Volume	10ul

\* Gradient conditions :

Time	Flow	Eluene A %	Eluent B %	Curve
Initial	1.0	90	10	
3	1.0	90	10	6
10	1.0	80	20	6
30	1.0	10	90	6
35	1.0	90	10	6
50	1.0	90	10	11

\* Quantitative analysis

Calibration curve : 10, 20, 50ppm of polyphenols

### 제 3 절 항산화 활성 분석

#### 1. 실험재료

DPPH(a,a'-diphenyl-b-picryl-hydrazyl), ascorbic acid, quercetin, curcumin, nitroblue tetrazolium (NBT), Xanthine, ethylene diaminetetraacetic acid(EDTA), Xanthine oxidase는 Sigma chemical Co.에서 구입하였고, Sodium nitroprusside(SNP)는 독일의 Fluka사로부터 구입하였다.

#### 2. 전자공여능(Electron Donating Ability, EDA) 측정

전자공여능(electron donating ability) 측정은 Blois 방법에 의한 DPPH free radical 소거법에 따라 측정하였다. 즉, 메탄올에 녹인 여러농도의 시료 각각을 96well plate에 100µl 씩 분주하고 0.4mM DPPH(a,a'-diphenyl-b-picryl-hydrazyl)용액을 동량 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 후 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 대조군으로는 ascorbic acid, quercetin, curcumin를 사용하였다. DPPH radical 소거활성은 아래의 식으로부터 산출하였고, DPPH의 흡광도가 50%감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC<sub>50</sub>)로 표시하였으며, 각 시료는 3회 반복 실험을 통하여 평균값을 구하였다.

$$\text{DPPH radical 소거활성(\%)} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

A<sub>sample</sub> = 시료를 첨가한 반응액의 흡광도

A<sub>control</sub> = 시료대신 메탄올을 첨가한 반응액의 흡광도

#### 3. Nitric oxide 소거 활성 측정

자연적으로 nitric oxide를 생성하는 물질인 Sodium nitroprusside(SNP)를 사용하여 시료의 nitric oxide 소거활성을 검색하였다. 10mM sodium nitroprusside(SNP)용액 200µl에 시료를 농도별로 첨가하고 25℃에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 반응액과 동일한 양의 Griess시약(1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine를 포함하는 2.5% (v/v) phosphoric acid)을 첨가하였다. 실온에서 10분 동안 반응시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하여, 잔존하는 아질산염(nitrite)의 양으로 nitric oxide 소거활성을 산출하였다. Nitric oxide 소거활성은 흡광도가 50%감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC<sub>50</sub>)로 표시하였다.

#### 4. Xanthine Oxidase 억제

Xanthine/Xanthine oxidase에 의한 uric acid 생성은 290nm에서 증가된 흡광도에 의해 측정하였다. 반응액은 각 농도별 각 시료와 0.5mM Xanthine, 200mM phosphate buffer (pH 7.5) 100ml로 용해한 1mM EDTA를 준비하였고, 이때 enzyme으로 50mU/ml Xanthine oxidase를 첨가하여 uric acid의 생성을 유도하였다.

#### 5. Superoxide 소거능 측정

Xanthine/ Xanthine oxidase system에 의해 발생하는 superoxide anion radical를 항산화제가 제거시키는 정도를 측정하기 위하여 0.5mM nitro blue tetrazolium(NBT)의 감소 정도를 통하여 항산화능을 측정하였다. 소거 활성은 각각 생성된 uric acid와 superoxide의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC<sub>50</sub>)로 표시하였다.

### 제 3 장 사업성과

#### 제 1 절 충전 장치에 대한 layout 및 충전기 사양

충진기는 크게 두 가지로 분류되는데 이는 충전기 주변 장치와 충전기 본장치로 구성된다.

##### 1) 충전기 주변 장치

충진기 주변 장치는 각종 배관라인으로서 이를 통해 질소가스가 공급되며 진공이 형성 된다. 각종 밸브는 비교적 고압임을 고려하여 볼 밸브를 배제하고, 니이들 밸브를 활용하였다. 주변 장치의 구성품 사양은 Table 4. 과 같다.

Table 4. 충전기 주변장치 사양

DESCRIPTION	SIZE
니이들 밸브	1/4
통니뿔	15A
압력계	1/4
사이푼	1/4
질소튜브	12mm
질소용기	

##### 2) 충전기 본체

충진기는 금속의 녹이 생엽에 침투하는 현상을 방지하기 위해 스테인레스(SUS)를 소재로 제작하였으며, 안전검사(PT Type)를 통과한 구조로 제작되었다.

공기 토출구는 1/4 " 규격으로 제작하여 필요시 개방할 수 있도록 하였고, 하부에 물빼기 밸브를 장착하였다. 용기 상부에 있는 헤드 즉 뚜껑은 I-BLOCK 형식으로 제작하여 충분한 압력에 견딜 수 있게 하였다.

온도제어장치는 크게 가열부와 제어부로 구분되며, 가열부에는 열전소자가 장착되어 있다. 가열부는 열전소자 외에 가열판과 방열판 그리고 방열팬을 포함하고 있다. 가열판은 열전소자에서 생성된 열을 용기에 공급하는 역할을 하며, 방열판은 열전소자 자체의 열을 방열팬

으로 보내는 역할을 담당한다. 열전소자의 자체의 온도가 지나치게 상승하게 되면 열전소자가 파괴되는 현상이 발생한다. 그리고 방열팬은 방열판에서 발생한 불필요한 열을 용기외부로 내보내는 역할을 한다. 제어부는 Micom 회로가 들어 있는 제어 회로부와 가열방지 회로부로 구성되어진다. 가열방지회로는 이상전원으로부터 제어회로부를 보호하는 기능을 한다.

온도제어장치는 충전기 내부에 위치하게 된다. Table 2. 는 충전기 본체의 사양을 보여 주고 있고, Table 3. 은 충전기 본체에 내장된 온도제어 장치의 사양을 보여준다.

Table 5. GABA 혐기처리 충전기 사양

DESCRIPTION	SIZE
Type E	PT(Pressure Tester)
Material	SUS 304
Capacity	60 LITER
Dimension	350Φ * 650L
Working Pressure	2 BAR
Design Pressure	5 BAR
In/Out Polishing	
Etc.	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Valve : 1/4"</li> <li>○ Fitting: Male Connector, Female Connector</li> <li>○ Gauge</li> <li>○ I-BOLT &amp; BLOCK</li> </ul>

Table 6. 온도제어 장치 사양

DESCRIPTION	SIZE
Temp. Controller	Micom(Pic Type)
Heating System	열전소자
Etc.	Cooling Plate
	Cooling Pan

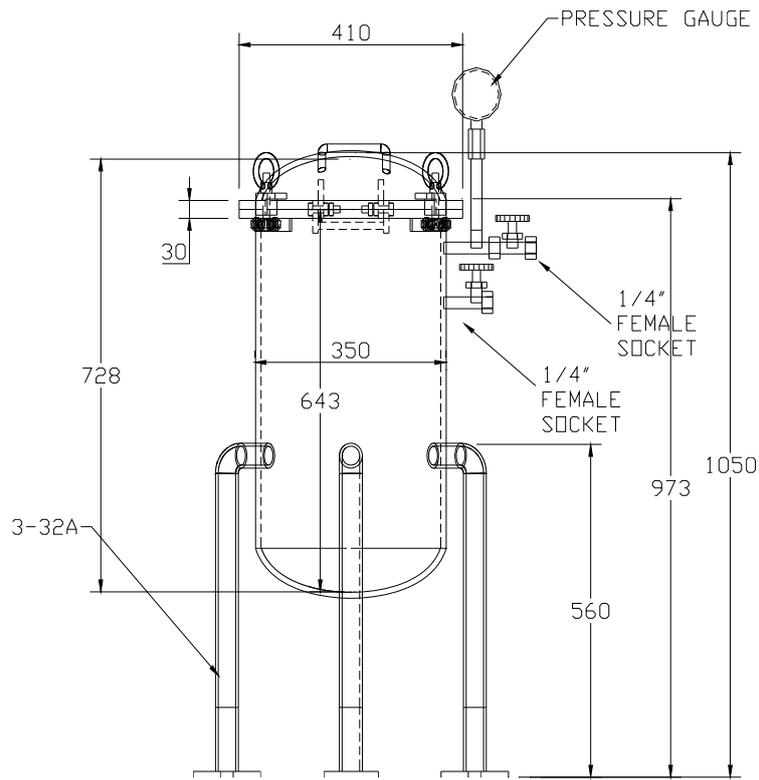


Fig. 5. GABA 혐기처리 제조장치 정면도.

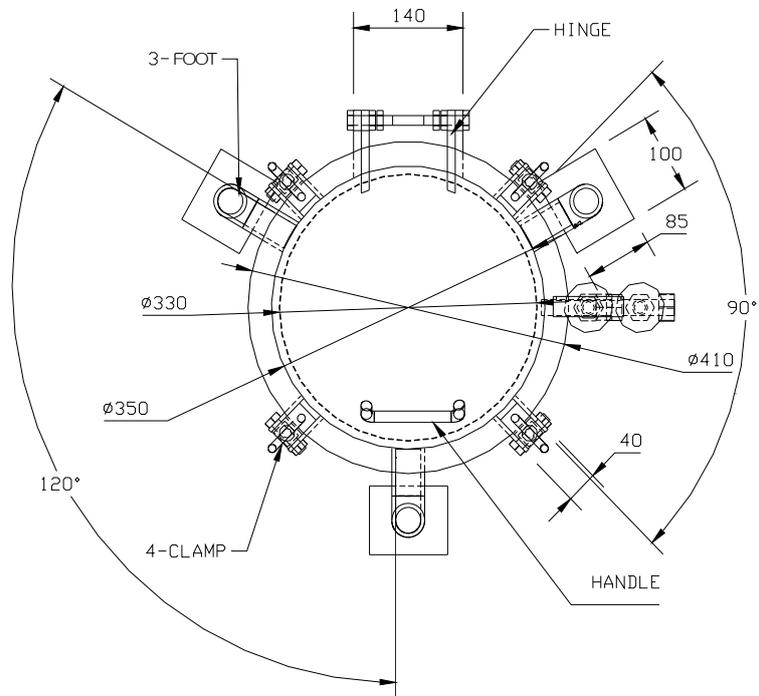


Fig. 6. GABA 혐기처리 제조장치 평면도.



Fig. 7. GABA 혐기처리 충전기 사진.

## 제 2 절 GABA tea 제조 및 성분 분석 결과

### 1. 아미노산 및 GABA 함량 분석

녹차 생엽을 진공처리 및 질소가스 치환처리의 혐기적 조건으로 하여 혐기 처리 시간의 경과에 따라 차를 제조한 후 GC-FID를 이용하여 아미노산 함량 및 GABA 함량의 변화를 혐기처리하지 않은 생엽과 비교 측정한 결과는 Table 7과 같다. 녹차를 질소처리장치를 이용하여 혐기적으로 처리한 경우 처리하지 않은 생엽에 비하여 alanine의 함량이 3~18배까지 현저하게 증가하였고 GABA인 경우 2배까지 함량이 증가하였다. 이러한 메카니즘은 차엽을 혐기적 조건으로 처리함으로써 차엽속의 glutamic acid가 glutamate decarboxylase에 의해 탈 탄산되어 GABA와 alanine을 생성하는 것으로 추정하고 있다. 혐기적 처리 조건하에서 진공처리와 질소처리사이의 차이는 온도에 영향을 받는 것으로 나타났다. 차엽중의 GABA를 최대 생성하기 위하여 유의할 점은 온도와 질소처리를 적절하게 하는 것이 중요한 것으로 사료된다.

Table 7. Changes of the amino acids contents of green tea in anaerobic conditions

Amino acids (mg/100g)	Control	Vacumn		Nitrogen			
		20℃	30℃	20℃	30℃	20℃	30℃
		6 hr	6 hr	6 hr	6 hr	12 hr	12 hr
alanine	7	8	13	8	17	10	129
valine	8	5	8	12	4	5	2
leucine	3	3	6	3	6	3	7
allo isoleucine	33	44	70	40	63	70	21
proline	7	12	35	9	45	14	69
asparatic acid	8	9	11	13	17	21	5
asparagine	26	41	50	12	62	32	74
GABA	89	109	106	109	138	88	211

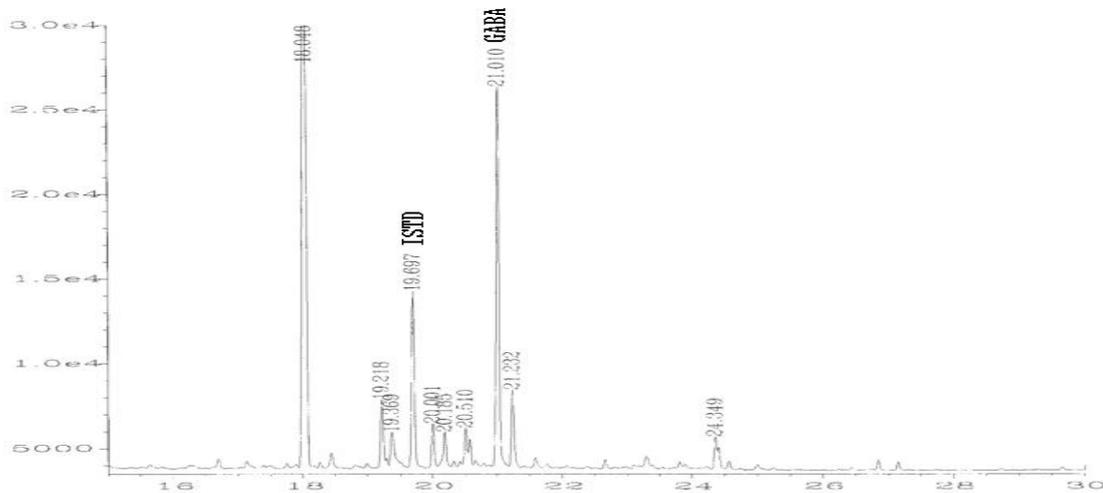


Fig. 8. GC Chromatogram of Amino acids from an extract of Green tea

## 2. 지방산 및 유기산 분석

차의 지방산에는 palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid 등 5종을 분리 정량하였다. 혐기처리별 지방산 함량의 변화는 크게 차이를 보이지 않았다. 차엽을 혐기적으로 처리하지 않은 그룹과 질소처리한 그룹사이에 있어서도 유의한 차이를 나타내지 않았다. 유기산에 있어서도 키나산, 호박산, 구연산 등으로 약 1~2% 함유되어 있다고 보고되고 있으며, 카테킨류의 항 산화 상승효과가 있는 것으로 알려져 있다. 지방산과 유사하게 혐기처리에 의한 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다.

Table 8. Changes of organic acid according to different anaerobic conditions

Organic acids (mg/g)	Control	Vacumn		Nitrogen			
		20℃	30℃	20℃	30℃	20℃	30℃
		6 hr	6 hr	6 hr	6 hr	12 hr	12 hr
Oxalic acid	4.91	4.66	5.25	4.28	5.01	4.94	4.87
Malonic acid	0.13	0.14	0.15	0.15	0.13	0.14	0.13
Succinic acid	0.13	0.15	0.20	0.12	0.27	0.11	0.20
Malic acid	1.07	0.85	1.33	1.02	1.57	0.97	0.76
Citric acid	4.58	4.15	3.54	4.68	4.03	4.28	3.82
C16	5.95	5.53	6.29	5.73	6.25	5.98	6.22
C18	0.29	0.27	0.33	0.27	0.31	0.28	0.30
C18:1	0.81	0.76	1.14	0.75	1.09	0.80	0.90
C18:2	5.35	5.00	5.77	5.04	5.66	5.47	5.50
C18:3	20.22	18.86	20.58	19.99	20.67	21.06	21.02

Table 9. GC conditions for fatty acid and organic acid composition analysis

Item	Condition
Instrument	H/P5890GC
Detector	FID 230°C
Column	30m × 0.32 mm id × 0.2um film thickness Coated with SP-2340
Column Flow	7.5 psig
Column oven temp	50°C for 10min. 2°C/min. programmed to 230°C for 60min.
Injection Volume	3ul split mode Quantitative analysis
ISTD method	25mg fatty acid methyl ester standard / 25ml chloroform (ISTD 12.5mg)

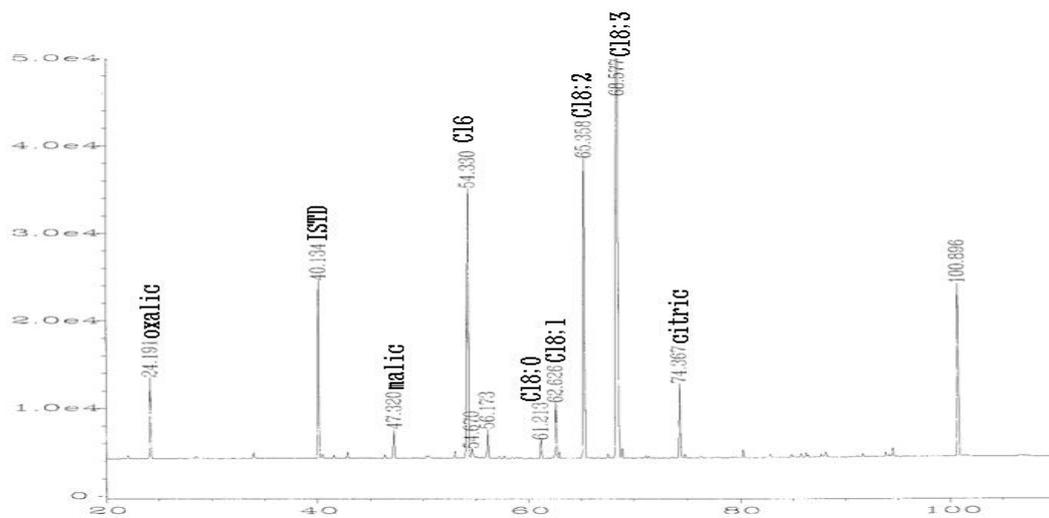


Fig. 9. GC Chromatogram of fatty acid and organic acid from an extract of Green tea

### 3. β-Sitosterol 분석

β-Sitosterol 분석은 GC를 이용하여 분석하였다. β-Sitosterol은 콜레스테롤의 흡수억제 효과가 뛰어나 전립선 비대, 고단백질 형성 억제 등의 효과가 있어 콜레스테롤 및 고지방에 의한 성인병의 치료 및 예방에도 좋다고 보고되고 있다.

Table 10. Changes of Sitosterol according to different anaerobic conditions

(mg/g)	Control	Vacumn		Nitrogen			
		20℃	30℃	20℃	30℃	20℃	30℃
		6 hr	6 hr	6 hr	6 hr	12 hr	12 hr
Sitosterol	17.49	16.7	15.13	16.48	15.75	12.44	11.51

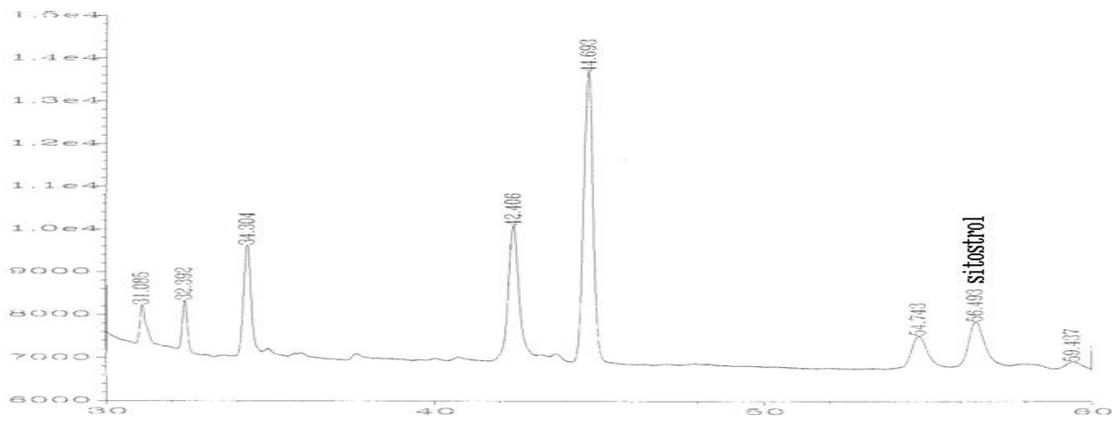


Figure 10. GC-FID fingerprint of sitosterol from an extract of Green tea

#### 4. 폴리페놀 분석(Polyphenol analysis)

폴리페놀 성분 분석 결과는 Table 11과 같다. Polyphenol 성분들은 항산화, 항균 및 항암 작용을 가진 대표적인 물질들로 보고 되고 있다. 또한 이들 성분의 효과 정도는 식물의 종류 및 항산화 성분의 종류에 따라 다르며, 추출 방법에 따라 차이가 난다고 알려져 있다. 일반적으로 녹차 생엽에는 탄닌이 10~20%, 카페인이 1.5~3%, 유리 아미노산이 2~3%, 비타민 C가 0.3~0.5%, 그리고 약 120여종의 정유성분이 소량 함유 되어 있다. 녹차에 있는 폴리페놀 화합물은 대부분이 물에 용해되는 수용성 성분들이며, 발효차인 우롱차나 홍차등에 있는 EGCG, EGC, ECG, EC등의 성분들은 녹차보다 적게 함유되어 있다.

non-ester형태의 EGC에서 대조군인 green tea보다 질소충진장치에서 혐기적 처리를 한 GABA tea에서 훨씬 높게 나타났으며, ester 형태의 EGCG와 ECG에서는 유의한 차이를 나타내지는 않았다. 또한 GC, catechin, EC, caffeine은 유의한 차이를 나타내지 않았다.

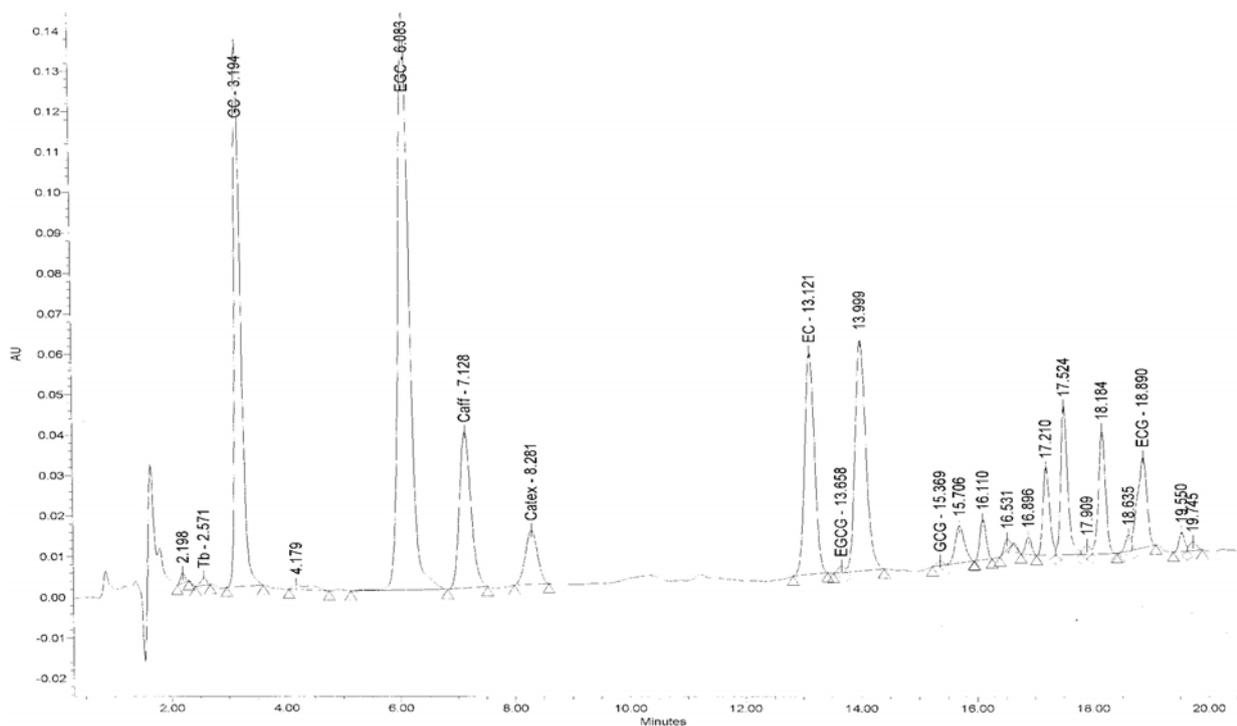


Fig. 11. HPLC chromatogram of Polyphenolic compounds in GABA tea and green tea.

Table 11. Contents of polyphenolic compounds in GABA tea and green tea

Compounds <sup>1</sup> (mg/g)	Control	Vacumn		Nitrogen			
		20°C	30°C	20°C	30°C	20°C	30°C
		6 hr	6 hr	6 hr	6 hr	12 hr	12 hr
TB	0.17	0.19	0.36	0.28	0.14	0.15	0.08
GC	6.39	6.82	6.72	7.05	6.43	6.55	6.31
EGC	12.95	12.54	11.88	16.6	14.87	15	12.01
C	1.19	1.36	1.38	1.23	1.18	1.25	1.11
EC	4.47	5.01	4.93	4.58	4.54	4.56	3.63
EGCG	4.66	4.58	4.12	4.65	5.14	5	4.2
GCG	0.79	0.87	0.83	0.52	0.83	0.78	0.64
ECG	1.56	2.03	1.69	1.78	1.3	1.22	1.17
Caffeine	4.75	4.85	4.83	5.44	4.95	4.73	5.15

<sup>1</sup>TB, theobromine; GC, galocatechin; EGC, epigallocatechin; C, catechin; EC, epicatechin; EGCG, epigallocatechin gallate; GCG, galocatechin gallate; ECG, epicatechin gallate

### 제 3 절 항산화 활성 분석

항산화 물질은 free radical와 반응하여 전자를 공여한후 식물 중의 항산화 효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 사용된다. DPPH는 안정한 유리기로 cysteine, glutathione과 같은 함유 황 아미노산과 ascorbic acid, aromatic amine등에 의해 환원되어 탈색되므로 항산화 물질의 항산화능 측정에 이용되고 있다. DPPH의 자유유리기 소거활성으로 질소충진 장치 및 진공상태에서 녹차의 항산화 활성을 측정 한 결과, 대조군과 진공상태보다는 질소충진 장치에서 높은 라디칼 소거 활성을 나타냈으며, 그 중에서도 12시간동안 30℃에서 제일 높은 라디칼 소거 활성을 보여 주었으며 대조군인 13  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 활성보다 12시간동안 30℃에서 질소충진 장치된 GABA tea가 6.62 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 유의적인 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

Table 1. Antioxidant activity of extracts derived from GABA tea and green tea

		IC <sub>50</sub> (ug/ml)			
		DPPH scavenging	Superoxide scavenging	Xnathine oxidase inhibition	Nitric oxide scavenging
Control		13.00±0.20	12.02±1.78	344.18±9.06	493.2±11.0
Vaccum	20℃ 6 hr	13.41±1.05	11.68±1.95	292.72±3.42	277.5±17.0
	30℃ 6 hr	9.91±0.64	9.27±0.39	275.00±0.95	405.1±17.6
Nitrogen	20℃ 6 hr	12.54±0.19	8.65±0.15	300.58±10.68	377.8±0.7
	30℃ 6 hr	8.46±0.55	8.20±0.79	258.46±1.31	374.1±1.7
	20℃ 12 hr	11.21±0.72	9.39±0.10	285.87±6.07	410.8±2.4
	30℃ 12 hr	6.62±0.62	9.01±0.74	265.05±2.96	480.2±14.0
EGCG		2.66±0.33	3.27±0.29	32.25±0.50	>1000
L-Ascorbic acid		31.53±1.30	-	-	-
Quercetin		24.13±0.00	-	-	>1000
Curcumin		4.67±0.31	-	-	>1000
Allopurinol		-	1.90±0.00	1.58±0.11	-

<sup>1</sup>DPPH is the free radical scavenging activity

생체의 대사 과정에서 발생하는 유해산소중의 하나인 superoxide(O<sub>2</sub>)는 superoxide dismutase(SOD)에 의하여 소거된다. 본 실험은 GABA tea 추출물의 SOD 활성을 비교하기 위하여 알아본 것이다. ATP를 생성하는 oxidative phosphorylation의 과정 동안 일부분의 산소가 free radical superoxide로 전환되며, 생성된 ·O<sub>2</sub>는 다른 활성산소물질(reactive oxygen species ; ROS)로 전환되어 세포손상을 유발하는 것으로 알려져 있다. 정상적으로는 ·O<sub>2</sub>는 내인성 항산화 방어기전에 의해 superoxide dismutase(SOD)에 의해 빠르게 과산화수소로 전환 된다 그러나, 이 내인성 항산화 방어체계가 세포내 산화-환원 균형을 유지하는데에 문제가 생길 경우 결과적으로 산화스트레스 가 일어나게 되며, 이 산화스트레스는 직접적으로 세포내 거대분자의 손상을 일으키거나 세포손상을 일으키는데 중요한 역할을 한다. Superoxide 유리기 소거활성은 생성된 수퍼옥사이드의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도 (IC<sub>50</sub>)로 표시하였다. Superoxide 유리기 소거활성에 대해서는 질소 충전 장치에서 6시간동안 처리된 GABA tea에서 소거활성을 나타냈다. Superoxide 소거활성이 가장 높게 나타난 GABA tea는 질소충진, 6시간, 30°C에서 IC<sub>50</sub> 값은 8.20 µg/ml로 나타났다.

NO는 산화를 통하여 효소의 작용을 조절하고 혈소판의 기능과 신경전달기능 및 림프구 증식을 변환시켜 암세포와 미생물에 대한 대식세포의 세포독성을 매개한다. 다량의 NO가 생성되면 nitrosation과 같은 산화반응을 야기하여 유해한 효과를 나타내게 된다. 질소 처리한 그룹에서 대조군에 비해 NO 생성 저해 활성을 나타냈으며, 진공상태에서 6시간, 20°C처리한 그룹에서 IC<sub>50</sub> 값은 277.5 µg/ml로 나타났다.

Xanthine oxidase는 생체 퓨린대사에 관여하는 효소로서 xanthine 또는 hypoxanthine으로부터 uric acid를 생성하며, 혈장내에 uric acid가 증가하면 골절에 축적되어 통풍을 유발할 뿐만 아니라 신장에 침착되어 신장질환을 일으킨다고 알려져 있다. 산소 유리기를 소거할 수 있는 물질 또한 산화적 손상의 예방에 유용할 것이다. 식물계에 존재하는 flavonoid류는 그들이 가지고 있는 hydroxyl의 위치에 따라 xanthine oxidase의 저해 활성이 다르며, galloflmf 함유하는 flavonoid 화합물이 그 효과가 우수하고 경쟁적으로 저해 작용을 한다고 보고되고 있다. 질소충진장치를 이용한 GABA tea의 xanthine oxidase 억제활성은 질소충진상태에서 6시간, 30°C처리한 그룹에서 IC<sub>50</sub> 값은 258.5 µg/ml로 나타났다

제 4 절 시제품사진





엠벨로프



태그



## 제 4 장. 결론

제주도 서귀포시 색달동 제주녹차영농조합법인 다원에서 생산된 녹차 생엽 야부키타(Yabukita) 품종을 2007년 10월에 수확하여 공간 부피가 약 60 liter에 해당되는 GABA 혐기처리장치에 일정량씩 담고, N<sub>2</sub> 가스와 진공으로 6시간과 12시간동안 혐기처리 하였다. 상온(17℃)과 30℃로 조정된 반응기에 시료를 넣고 온도와 시간 변화에 따라 혐기 처리하였다.

녹차의 GABA 혐기처리 조건을 검토하기 위하여 제조장치는 충전기 내부를 적정 질소 압력(25~30 PSI)으로 유지하며 녹차를 혐기 처리하며 충전기 내부는 진공상태로 보전하였다. 또한 가열시스템으로 열전소자를 활용하여 충전기 내부를 17℃에서 30℃로 유지하며, 가열시스템에 마이콤(Micom)를 이용하여 온도 제어장치를 구성하도록 하여 적절한 온도제어를 할 수 있도록 시스템을 구성하였다.

차의 제조는 300℃ 무쇠솥에서 5분 뒤은 뒤 즙이 나올 때까지 비빈 다음 식혀서 2차 뒤음을 하였고, 2차 뒤음은 250℃에서 3분 뒤은 후 털어준 다음 계속하여 6번 뒤음과 털어주는 작업을 반복하였으며, 마무리는 재의 열을 이용하여 90분 동안 뒤어서 제조하였다.

녹차를 질소처리장치를 이용하여 혐기적으로 처리한 경우 처리하지 않은 생엽에 비하여 alanine의 함량이 3~18배까지 현저하게 증가하였고 GABA인 경우 2배까지 함량이 증가하였다. 아미노산 함량에 있어서 혐기적 처리 조건하에서 진공처리와 질소처리사이의 차이는 온도에 영향을 받는 것으로 나타났다. 차엽중의 GABA를 최대 생성하기 위하여 유의할 점은 온도와 질소처리를 적절하게 하는 것이 중요한 것으로 사료된다.

지방산 분석에서는 palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid 등 5종을 분리 정량하였다. 혐기처리별 지방산 함량의 변화는 크게 차이를 보이지 않았으며, 유기산인 경우에도 혐기처리에 의한 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다.

Polyphenol 성분들중 non-ester형태의 EGC에서 대조군인 green tea보다 질소충진장치에서 혐기적 처리를 한 GABA tea에서 훨씬 높게 나타났으며, ester 형태의 EGCG와 ECG에서는 유의한 차이를 나타내지는 않았다. 또한 GC, catechin, EC, caffeine은 유의한 차이를 나타내지 않았다.

GABA tea를 생산하기 위한 질소충진 장치를 이용하여 항산화 효과를 관찰하였다. GABA tea 추출물은 DPPH radical 소거작용과 xanthine oxidase에 의한 superoxide 소거작용 뿐만 아니라 superoxide의 생성을 억제하는 작용으로 미루어 보아, free radical을 소거하는 항산화 작용이 있는 것으로 사료된다.