(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0027180
(43) 공개일자 2009년03월16일

(51) Int. Cl.
A23F 3/00 (2006.01) *A23F 3/20* (2006.01)
A23F 3/16 (2006.01) *A23F 3/06* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0089994
(22) 출원일자 2008년09월11일
심사청구일자 2008년09월11일
(30) 우선권주장
1020070092193 2007년09월11일 대한민국(KR)

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구 달서구 신당동 1000번지
(72) 발명자
송대규
대구광역시 수성구 황금동 367 캐슬골드파크 1302-1505
(74) 대리인
특허법인무한

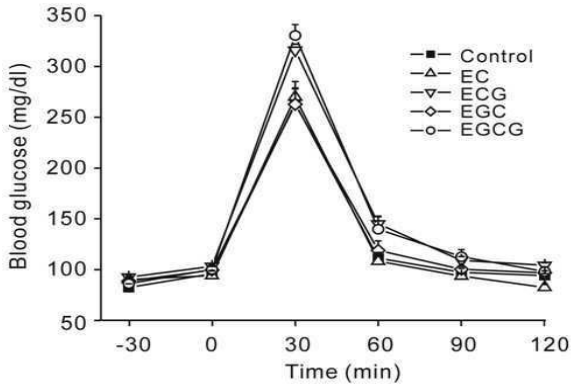
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 녹차로부터 갈레이트 카테킨 및 파라치온을 제거하는 방법 및 이를 이용하여 제조된 녹차 음료 및 분말 녹차

(57) 요 약

본 발명은 녹차 추출액을 에틸 아세테이트, 세틸트리메틸암모늄브로마이드 (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB), 양이온 교환 수지, 음이온 교환 수지, C18 비드 및 PEG(polyethylene glycol) 비드 중 적어도 하나의 성분으로 처리하여 녹차로부터 에피갈로카테킨 갈레이트 (epigallocatechin gallate, EGCG), 에피카테킨 갈레이트 (epicatechin gallate, ECG) 및 파라치온(parathion)을 제거하는 방법을 제공한다. 또한, 이를 이용한 녹차 음료의 제조 방법 및 상기 방법에 의하여 제조된 녹차 음료 및 분말 상태로 복용 가능한 분말 녹차를 제공한다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

녹차 추출액을 에틸 아세테이트, 세틸트리메틸암모늄브로마이드 (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB), 양이온 교환 수지, 음이온 교환 수지, C18 비드 및 PEG 비드 중 적어도 하나의 성분으로 처리하여 녹차로부터 에피갈로카테킨 갈레이트 (epigallocatechin gallate, EGCG), 에피카테킨 갈레이트 (epicatechin gallate, ECG) 및 파라치온(parathion)을 제거하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 방법은,

상기 녹차 추출액 100 부피부 대비 50 내지 200 부피부의 에틸 아세테이트를 상기 녹차 추출액과 혼합하여 에틸 아세테이트 및 녹차 추출액의 혼합액을 준비하는 단계; 및

상기 혼합액으로부터 상기 에틸 아세테이트를 분리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 녹차 추출액으로부터 EGCG, ECG 및 파라치온을 제거하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 방법은,

CTAB를 상기 녹차 추출액에 첨가하여 및 교반한 후, 상기 CTAB를 상기 녹차 추출액으로부터 분리하는 것을 특징으로 하는, 녹차 추출액으로부터 EGCG, ECG 및 파라치온을 제거하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 CTAB는 상기 녹차 추출액 100 중량부 대비 0.05 내지 0.1 중량부가 되도록 첨가되는 것을 특징으로 하는, 녹차 추출액으로부터 EGCG, ECG 및 파라치온을 제거하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 방법은,

상기 양이온 교환 수지 성분이 포함된 여과지 또는 상기 양이온 교환 수지 성분이 적층된 관을 통하여 상기 녹차 추출액을 통과시키는 것을 특징으로 하는, 녹차 추출액으로부터 EGCG, ECG 및 파라치온을 제거하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 방법은,

상기 양이온 교환 수지를 상기 녹차 추출액에 첨가한 후, 상기 양이온 교환 수지를 상기 녹차 추출액으로부터 분리하는 것을 특징으로 하는, 녹차 추출액으로부터 EGCG, ECG 및 파라치온을 제거하는 방법.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서,

상기 양이온교환 수지는 사용되는 상기 녹차 추출액 100 중량부 대비 0.05 내지 100 중량부로 사용되는 것을 특징으로 하는, 녹차 추출액으로부터 EGCG 및 ECG 그리고 파라치온을 제거하는 방법

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 양이온교환 수지는 4 내지 6M의 NaCl 용액, 1 내지 2.5M의 $Ca(O_2CCH_3)$ 용액 및 2 내지 4M의 KCl 용액 중 적어도 하나의 용액으로 활성화 시킨 것임을 특징으로 하는, 녹차 추출액으로부터 EGCG, ECG 및 파라치온을 제거하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 방법은,

상기 C18 비드를 상기 녹차 추출액에 첨가 및 교반한 후, 상기 C18 비드를 상기 녹차 추출액으로부터 분리하는 것을 특징으로 하는, 녹차 추출액으로부터 EGCG, ECG 및 파라치온을 제거하는 방법.

청구항 10

제10항에 있어서,

상기 C18 비드는 상기 녹차 추출액 100 중량부 대비 1 내지 50 중량부로 사용되는 것을 특징으로 하는, 녹차 추출액으로부터 EGCG, ECG 및 파라치온을 제거하는 방법

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 방법은,

상기 PEG 비드를 상기 녹차 추출액에 첨가 및 교반한 후, 상기 PEG 비드를 상기 녹차 추출액으로부터 분리하는 것을 특징으로 하는, 녹차 추출액으로부터 EGCG, ECG 및 파라치온을 제거하는 방법.

청구항 12

제12항에 있어서,

상기 PEG 비드는 상기 녹차 추출액 100 중량부 대비 0.01 내지 50 중량부로 사용되는 것을 특징으로 하는, 녹차 추출액으로부터 EGCG, ECG 및 파라치온을 제거하는 방법

청구항 13

건조된 녹차 잎 또는 녹차 분말을 수(水) 추출하여 녹차 추출액을 준비하는 단계; 및

상기 수용성 녹차 추출액에 에틸 아세테이트, 세틸트리메틸암모늄브로마이드 (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB), 양이온 교환 수지, 음이온 교환 수지, C18 비드 및 PEG 비드 중 적어도 하나의 성분으로 처리하여 녹차로부터 에피갈로카테킨 갈레이트 (epigallocatechin gallate, EGCG), 에피카테킨 갈레이트 (epicatechin gallate, ECG) 및 파라치온(parathion)을 제거하는 단계를 포함하는 녹차 음료의 제조 방법.

청구항 14

녹차 수(水) 추출액 100 중량부; 및

폴리에틸렌 글리콜(PEG) 0.1 내지 30 중량부를 포함하는 녹차 음료.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 PEG는 평균 분자량 200에서 14,000이고 고분자의 한쪽 끝의 히드록시기를 저급알킬기와 결합시킨 것을 특징으로 하는 녹차 음료.

청구항 16

녹차 추출액을 에틸 아세테이트, 세틸트리메틸암모늄브로마이드 (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB),

양이온 교환 수지, 음이온 교환 수지, C18 비드 및 PEG 비드 중 적어도 하나의 성분으로 처리하여 녹차로부터 에피갈로카테킨 갈레이트 (epigallocatechin gallate, EGCG), 에피카테킨 갈레이트 (epicatechin gallate, ECG) 및 파라치온(parathion)을 제거하는 단계; 및

에피갈로카테킨 갈레이트 (epigallocatechin gallate, EGCG), 에피카테킨 갈레이트 (epicatechin gallate, ECG) 및 파라치온(parathion)이 제거된 녹차 추출액을 동결 건조하여 분말화 하는 단계를 포함하는, 분말 형태로 복용 가능한 분말 녹차의 제조하는 방법.

청구항 17

녹차 추출액을 동결 건조 하여 수되득거나 건조된 녹차 잎을 분쇄하여 준비된 녹차 고형분 100 중량부; 및

폴리에틸렌 글리콜 0.1 내지 200 중량부를 포함하고 분말 형태 또는 물에 녹이거나 분산시켜 복용 가능한 분말 녹차.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 녹차 추출액으로부터 유해성분을 제거하는 방법 및 이를 이용하여 제조된 녹차 음료 및 분말 녹차에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 녹차 추출액으로부터 당뇨 및 비만에 유해한 것으로 판단되는 갈레이티드 카테킨(gallated catechin), 특히 에피갈로카테킨 갈레이트 (epigallocatechin gallate, EGCG) 및 에피카테킨 갈레이트 (epicatechin gallate, ECG), 및 농약 성분인 파라치온(parathion)을 효과적으로 제거할 수 있는 방법 및 이를 이용하여 제조된 녹차 음료 및 분말 녹차에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 녹차 (*Camellia sinensis*)와 그 추출물인 카테킨이라는 화합물은 많은 좋은 효과가 있다고 알려져 있다. 이러한 효과로는 항암효과, 항동맥경화(anti-atherosclerotic), 비만억제(anti-obesity), 지방생산 억제(anti-lipogenensis), 항염(anti-inflammatory), 항균효과(anti-pathogen) 등이 있다. 녹차의 가장 중요한 성분은 폴리페놀 에피카테킨으로 그 종류로는(-)-에피갈로카테킨(epigallocatechin)-3-갈레이트(gallate) (EGCG), (-)-에피갈로카테킨(epigallocatechin)(EGC), (-)-에피카테킨(epicatechin)-3-갈레이트(gallate)(ECG) 그리고 (-)-에피카테킨(epicatechin) 등이 있다. 이 중에서도 EGCG는 가장 많은 양을 차지하고 있으며 세포에서 항산화 효과 또는 산화촉진 효과, 단백질 효소의 활성화 조절, 프로모터 그리고 핵산과 이온 통로 등의 막 결합 단백질에도 작용을 한다. 하지만 EGCG의 유해한 가능성에 대한 보고는 거의 없었다.

<3> 또한 대부분의 유익하다고 알려진 데이터에서는 EGCG 농도가 10-100㎛M이었다. 사람의 혈장에서 EGCG가 10 ㎛M에 도달하려면 50-60잔의 녹차를 마셔야 한다. 많은 종류의 프로틴 키나제(protein kinase)들은 카테킨 등의 여러 플라보노이드와 ATP 경쟁적 또는 비경쟁적인 방법으로 활성이 조절된다. 그러나 ATP-민감성 칼륨 (K_{ATP}) 통로를 억제하는 ATP 결합 부위는 이런 프로틴 키나제 와는 다르다. 게다가 최근의 연구들은 ATP의 α-, β-, γ-인산 꼬리가 내향성(inward-rectifying) K^+ 통로의 R201, K185, R50 부위와 상호작용한다는 것을 보여준다. ATP 아네닌 고리의 N6원자는 주로 E179와 R301과 작용한다.

<4> K_{ATP} 통로는 세포막흥분성(membrane excitability)과 커플링 기전을 통해 생리학적인 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 췌장 베타세포에서 인슐린 분비를 조절하고, 식이조절 신경에서 글루코스-센싱(glucose-sensing) 메카니즘을 통해 혈중 포도당을 일정수준으로 유지시키는데 기여한다.

<5> K_{ATP} 통로는 4개의 Kir 유닛과 4개의 설포닐우레아 수용체(sulfonylurea receptor) (SUR)로 이루어진 8량체이다. K_{ATP} 통로는 Kir6.2 서브유닛에 작용하는 ATP에 의해서 억제되고 SUR 서브유닛에 작용하는 MgADP에 의해서 활성화된다. 게다가 긴사슬(long-chain) 아실-CoA(acyl-CoA)와 PIP2 (이인산포스파티딜이노시톨)와 PIP3(삼인산포스파티딜이노시톨) 같은 PIP (디인산포스파티딜이노시톨, phosphatidylinositol polyphosphates) 역시 Kir6.2 서브유닛을 통해 K_{ATP} 통로를 활성화시키는 중요한 역할을 한다. Kir6.2에서 ATP와 PIP의 민감성은 SUR서브 유닛이 없을 때 보다 있을 때 더 증가하는 것으로 알려져 있다. ATP와 PIP의 채널 민감성에 영향을 주는 작용은 SUR 서

브유닛에 의해 증가되는 것으로 최근 연구에서 알려졌다.

<6> 우리의 이전 연구에서 갈레이트 에스테르(gallate ester)기를 가지고 있는 EGCG와 ECG가 지질막의 인지질(phospholipids)과 알로스테릭한 상호작용을 통해 K_{ATP} 채널의 활성을 억제한다는 것을 보여주었다. 그렇지만 효과적인 EGCG의 농도는 10μM 이상이었다. 이번 연구에서는 실험한 녹차 에피카테킨 중에서 오직 EGCG만이 K_{ATP} 채널에서 ATP와 PIP의 민감성을 감소시킨다는 것을 관찰하였다. 그것은 췌장 베타세포에서 포도당 자극에 의한 인슐린 반응이 감소한다는 것에 귀착한다고 결론을 내렸다. 왜냐하면 효과가 있는 EGCG 농도는 사람이 공복에 2-8잔의 녹차를 마셨을 때 도달할 수 있는 농도인 약 1-10μM이었기 때문에 특히 당뇨 환자나 당뇨소인을 가진 사람에서는 녹차를 마시는데 주의할 필요가 있다. 또한 도 1 및 도 2 에서 나타나는 포도당 복용 후 혈중 포도당의 정상적 제거 반응이 늦게 나타나는 것(당내성장애; glucose intolerance)은 상기 기전 외에도 포도당 제거에 중요한 역할을 하는 간세포, 지방세포 및 근육세포에서의 포도당 흡수 장애가 gallated catechin, 즉 EGCG, ECG 에 의해서 나타날 수 있다는 것이다(Naftalin RJ et al: Brit J Pharmacol (2003) 140,487-499). 만일 이와 같이 식후에 혈중에서의 혈당제거가 원활하지 못하다면, 장기간 고농도의 혈당에 노출되고 따라서 당뇨병이 발생하거나, 악화되거나, 혈관 손상 등 당뇨병의 부작용이 심화될 수 있다.

<7> 이러한 현상은 혈중 EGCG 농도가 10μM 이하에서도 가능하므로 일반적인 녹차음용으로 충분히 일어날 수 있는 현상이다. K_{ATP} channel에서의 작용과 다르게 녹차에 의한 당내성 장애는 EGCG 뿐만 아니라 ECG 등 모든 갈레이티드 카테킨(gallated catechin)에서 나타날 수 있다(Naftalin RJ et al: Brit J Pharmacol (2003) 140,487-499).

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<8> 본 발명의 목적은 상술한 바와 같은 발명자의 연구 결과를 토대로 완성된 발명으로서, 본 연구 결과에 따른 당뇨 유해 물질인 갈레이티드 카테킨(gallated catechin) 및 인체에 유해한 농약 성분인 파라치온(parathion)을 녹차로부터 효과적으로 제거할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

<9> 본 발명의 다른 목적은 상기 제거 방법을 이용한 기능성 녹차 음료 제조 방법을 제공하는 것이다.

<10> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법들에 의하여 제조된 녹차 음료를 제공하는 것이다.

<11> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법들에 의하여 제조되고 분말 형태로 복용 가능한 분말 녹차를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<12> 본 발명의 일 측면에 따른, 녹차 추출액으로부터 에피갈로카테킨 갈레이트 (epigallocatechin gallate, EGCG), 에피카테킨 갈레이트 (epicatechin gallate, ECG) 및 파라치온(parathion)을 제거하는 방법은, 녹차 추출액을 에틸 아세테이트, 세틸트리메틸암모늄브로마이드 (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB), 양이온 교환 수지, 음이온 교환 수지, C18 비드 및 PEG 비드 중 적어도 하나의 성분으로 처리하는 단계를 포함한다.

<13> 상기 처리 단계는 상기 녹차 추출액 100 부피부 대비 50 내지 200 부피부의 에틸 아세테이트를 상기 녹차 추출액과 혼합하여 에틸 아세테이트 및 녹차 추출액의 혼합액을 준비하는 단계 및 상기 혼합액으로부터 상기 에틸 아세테이트를 분리하는 단계를 포함할 수 있다.

<14> 상기 처리 단계는 CTAB를 상기 녹차 추출액에 첨가하여 및 교반한 후, 상기 CTAB를 상기 녹차 추출액으로부터 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 CTAB는 원심분리법에 의하여 상기 녹차 추출액으로부터 분리될 수 있다. 상기 CTAB는 상기 녹차 추출액 100 중량부 대비 0.05 내지 0.1 중량부가 되도록 첨가된다.

<15> 상기 처리 단계는 상기 양이온 교환 수지 성분이 포함된 여과지 또는 상기 양이온 교환 수지 성분이 적층된 관을 통하여 상기 녹차 추출액을 통과시킴으로써 이루어 질 수 있다. 이와 다르게, 상기 처리 단계는 상기 양이온 교환 수지를 상기 녹차 추출액에 첨가한 후, 상기 양이온 교환 수지를 상기 녹차 추출액으로부터 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 양이온교환 수지는 상기 녹차 추출액 100 중량부 대비 0.05 내지 100 중량부로 사용된다. 상기 양이온교환 수지는 4 내지 6M의 NaCl 용액, 1 내지 2.5M의 $Ca(O_2CCH_3)$ 용액 및 2 내지 4M의 KCl 용액 중 적어도 하나의 용액으로 활성화 시킨 것일 수 있다.

<16> 상기 처리 단계는 상기 C18 비드를 상기 녹차 추출액에 첨가 및 교반한 후, 상기 C18 비드를 상기 녹차 추출액으로부터 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 C18 비드는 상기 녹차 추출액 100 중량부 대비 1 내지 50 중량부로 사용된다.

<17> 상기 처리 단계는 상기 PEG 비드를 상기 녹차 추출액에 첨가 및 교반한 후, 상기 PEG 비드를 상기 녹차 추출액으로부터 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 PEG 비드는 상기 녹차 추출액 100 중량부 대비 0.01 내지 50 중량부로 사용된다.

<18> 본 발명의 일 다른 측면에 따른, 녹차 음료의 제조 방법은 건조된 녹차 잎 또는 녹차 분말을 수(水) 추출하여 녹차 추출액을 준비하는 단계, 및 상기 수용성 녹차 추출액에 에틸 아세테이트, 세틸트리메틸암모늄브로마이드(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB), 양이온 교환 수지, 음이온 교환 수지, C18 비드 및 PEG 비드 중 적어도 하나의 성분으로 처리하여 녹차로부터 에피갈로카테킨 갈레이트 (epigallocatechin gallate, EGCG), 에피카테킨 갈레이트 (epicatechin gallate, ECG) 및 파라치온(parathion)을 제거하는 단계를 포함한다.

<19> 본 발명의 또 다른 측면에 따른 녹차 음료는 녹차 수(水) 추출액 100 중량부, 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 0.1 내지 30 중량부를 포함한다. 상기 PEG는 메톡시 기 등의 PEG 안정화 기를 포함할 수 있다.

<20> 본 발명의 또 다른 측면에 따른 분말 녹차의 제조 방법은, 녹차 추출액을 에틸 아세테이트, 세틸트리메틸암모늄브로마이드 (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB), 양이온 교환 수지, 음이온 교환 수지, C18 비드 및 PEG 비드 중 적어도 하나의 성분으로 처리하여 녹차로부터 에피갈로카테킨 갈레이트 (epigallocatechin gallate, EGCG), 에피카테킨 갈레이트 (epicatechin gallate, ECG) 및 파라치온(parathion)을 제거하는 단계, 및 에피갈로카테킨 갈레이트 (epigallocatechin gallate, EGCG), 에피카테킨 갈레이트 (epicatechin gallate, ECG) 및 파라치온(parathion)이 제거된 녹차 추출액을 동결 건조하여 분말화 하는 단계를 포함한다.

<21> 본 발명의 또 다른 측면에 따른 분말 녹차는 녹차 추출액 또는 녹차 추출액과 폴리에틸렌 글리콜을 혼합한 용액을 동결 건조하여 수득된 녹차 고형분 100 중량부, 및 폴리에틸렌 글리콜 0.1 내지 50 중량부를 포함한다.

효 과

<22> 본 발명에 따른 EGCG, ECG 및 파라치온의 제거 방법은 녹차 추출액으로부터 당뇨와 연관되어 인체에 해로울 가능성이 있는 EGCG 및 ECG를 효과적으로 제거할 수 있을 뿐만 아니라, 인체에 해로운 농약성분인 파라치온을 효과적으로 제거할 수 있다.

<23> 따라서, 상기 방법을 이용하면 건강에 보다 유익한 녹차 음료 또는 식용 가능한 분말 녹차를 제조할 수 있어 녹차의 장점을 극대화 할 수 있다.

<24> 이상과 같이 본 발명은 비록 한정된 실시예에 의해 설명되었으나, 본 발명은 상기의 실시예에 한정되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이러한 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 그러므로, 본 발명의 범위는 설명된 실시예에 국한되어 정해져서는 아니 되며, 후술하는 특허청구범위뿐 아니라 이 특허청구 범위와 균등한 것들에 의해 정해져야 한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<25> 이하에서는 본 발명을 더욱 상세하게 설명하도록 한다.

<26> 본 발명에 따른, 녹차 추출액으로부터 갈레이티드 카테킨(gallated catechin), 특히 에피갈로카테킨 갈레이트 (epigallocatechin gallate, EGCG), 에피카테킨 갈레이트 (epicatechin gallate, ECG) 및 파라치온(parathion)을 제거하기 위한 방법은 세부적으로는 여섯 가지로 분류될 수 있다. 구체적으로는 상기 녹차 추출액을 에틸 아세테이트(ethyl acetate)로 처리하는 방법, 세틸트리메틸암모늄브로마이드 (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide CTAB)로 처리하는 방법, 양이온 교환 수지로 처리하는 방법, 음이온 교환 수지로 처리하는 방법, C18 비드로 처리하는 방법 및 PEG 비드로 처리하는 방법으로 구분될 수 있다.

<27> 이하에서는 각각의 방법을 구분하여 설명하도록 한다.

<28> 에틸 아세테이트 처리를 이용한 제거방법

<29> 상기 에틸 아세테이트는 상온에서 액상으로서, 상기 녹차 추출액으로부터 EGCG, ECG 및 파라치온을 제거하기 위하여 상기 녹차 추출액에 일정 시간 혼합되도록 한다.

<30> 상기 에틸 아세테이트는 상기 녹차 추출액 100 부피부 대비 50 내지 200 부피부로 포함된다. 에틸 아세테이트의 혼합량이 상기 녹차 추출액 100 부피부 대비 50 부피부 미만이면 에피갈로 카테킨의 제거가 효과적이지 않다. 반면에, 상기 녹차 추출액 100 부피부 대비 200 부피를 초과하여도 큰 문제는 없으나 추출 효율이 크게 증가되지 않는다. 특히, 상기 에틸 아세테이트의 혼합량은 상기 녹차 추출액 100 부피부 대비 80 내지 120 부피부인 것이 바람직하다.

<31> 또한, 상기 녹차 추출액과 에틸 아세테이트의 혼합 유지 시간은 공정 효율을 고려하여 2 내지 20분 정도가 바람직하다.

<32> 상기와 같이, 일정시간 녹차 추출액과 에틸 아세테이트의 혼합 상태가 유지되면 녹차 추출액 내의 EGCG, ECG 및 파라치온 성분이 상기 에틸 아세테이트에 선택적으로 용해될 수 있다.

<33> 혼합 상태가 완료되면, 상기 에틸 아세테이트는 원심분리법, 층분리법 등을 이용하여 상기 녹차 추출액과 분리될 수 있다. 이 결과, 녹차 추출액 내의 EGCG 및 파라치온 성분이 선택적으로 제거될 수 있다.

<34> 후술할 실시예에서 알 수 있을 것이지만, EGCG 및 ECG 이외의 다른 카테킨 성분까지 같이 제거가 되나 다른 카테킨 성분에 비해 EGCG 및 ECG를 상대적으로 많이 제거할 수 있게 된다.

<35> 이러한 에틸 아세테이트에 의한 EGCG, ECG 및 파라치온의 제거 기능은 기존의 녹차 음료 제조 공정에 추가적으로 적용되어 보다 건강에 유익한 녹차 음료를 제조할 수 있다.

<36> 즉, 상기 녹차 음료의 제거 방법은, 건조된 녹차 잎을 열수 추출 등에 의한 물을 이용한 추출 방법에 의하여 1차적으로 녹차 추출 수용액을 준비하고 상기 녹차 추출 수용액에 에틸 아세테이트를 혼합한 후 소정 시간 후에 상기 에틸 아세테이트를 분리함으로써 이루어질 수 있다.

<37>

<38> CTAB 처리를 이용한 제거방법

<39> EGCG, ECG 및 파라치온을 제거하는 다른 방법으로서, 고형인 세틸트리메틸암모늄 브로마이드(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB)를 녹차 추출액에 직접 첨가 혼합한 후, 소정 시간 이후에 상기 CTAB를 원심분리를 이용하여 제거할 수도 있다.

<40> CTAB를 직접 녹차 추출액에 첨가하여 EGCG, ECG 및 파라치온을 제거하기 위해서는 상기 녹차 추출액 100 중량부 대비 0.05 내지 0.1 중량부로 포함되어야 한다. 상기 범위를 벗어나면, EGCG 제거 효과가 나타나지 않는다.

<41> 양이온교환 수지를 이용한 제거방법

<42> EGCG, ECG 및 파라치온을 제거하기 위한 다른 방법으로서, 고형인 양이온교환 수지가 적층된 여과지 또는 상기 양이온교환 수지가 적층된 관을 통하여 상기 녹차 추출액을 통과시킴으로써, 상기 EGCG, ECG 및 파라치온을 선택적으로 제거할 수 있다.

<43> 이와 다르게 상기 양이온 교환수지를 상기 녹차 추출액에 직접 첨가한 후 상기 양이온교환 수지를 여과를 이용하여 제거함으로써 EGCG, ECG 및 파라치온을 제거할 수도 있다.

<44> 상기 양이온 교환 수지의 사용량은 상기 녹차 추출액 100 중량부 대비 0.05 내지 100 중량부인 것이 바람직하다.

<45> 상기 적층의 의미는, 여과지 위에 상기 양이온 교환 수지를 단순히 위치시켜 놓은 것까지 포함하는 개념으로서, 상기 양이온 교환 수지의 적층에 의한 방식은 주로 상기 녹차 추출액을 수직적으로 유동시켜 여과시키는 공정에 적용하기에 적합하다.

<46> 상기 양이온교환 수지의 처리를 이용한 제거방법으로, 이와 다르게 상기 양이온 교환 수지를 녹차 추출액에 직접 첨가 혼합한 후, 소정 시간 이후에 상기 양이온 교환 수지를 여과를 이용하여 제거할 수도 있다. 이 경우, 적층을 이용한 제거 방법에 비하여 상대적으로 녹차 추출액과의 접촉 면적 및 시간이 충분하여 양이온 교환 수지를 상기 적층을 이용한 방식보다 적게 사용 가능하다.

<47> 상기 양이온 교환 수지를 이용한 EGCG, ECG 및 파라치온 제거 방법은 대량생산 체계의 공장 스케일이나 소규모 음료 판매점 및 개인적인 실시인지에 따라 적절히 선택될 수 있다. 예를 들면, 소규모 실시인 경우 건조 녹차 잎으로부터 일차적으로 여과지를 통하여 녹차 추출액을 제조하고 이어서 본 발명에 따른 여과방식을 추가적으로

적용함으로써 기능성 녹차 음료를 제조할 수 있을 것이다.

<48> 상기 양이온교환 수지로서는, 4 내지 6M의 HCl 용액으로 활성화 시킨 것을 사용한다. 또는 상기 양이온 교환 수지로서는, 4 내지 6M의 NaCl 용액, 1 내지 2.5M의 $Ca(O_2CCH_3)$ 용액 및 2 내지 4M의 KCl 용액으로 활성화 시킨 것을 사용한다.

<49> 음이온교환 수지를 이용한 제거방법

<50> EGCG, ECG 및 파라치온을 제거하기 위한 다른 방법으로서, 고형인 음이온교환 수지가 적층된 여과지 또는 상기 양이온교환 수지가 적층된 관을 통하여 상기 녹차 추출액을 통과시킴으로써, 상기 EGCG, ECG 및 파라치온을 선택적으로 제거할 수 있다.

<51> 이와 다르게 상기 음이온 교환수지를 상기 녹차 추출액에 직접 첨가한 후 상기 음이온교환 수지를 여과를 이용하여 제거함으로써 EGCG, ECG 및 파라치온을 제거할 수도 있다.

<52> 상기 음이온 교환 수지의 사용량은 상기 녹차 추출액 100 중량부 대비 1 내지 50 중량부인 것이 바람직하다.

<53> 상기 적층의 의미는, 여과지 위에 상기 음이온 교환 수지를 단순히 위치시켜 놓은 것까지 포함하는 개념으로서, 상기 음이온 교환 수지의 적층층에 의한 방식은 주로 상기 녹차 추출액을 수직적으로 유동시켜 여과시키는 공정에 적용하기에 적합하다.

<54> 상기 음이온교환 수지의 처리를 이용한 제거방법으로, 이와 다르게 상기 음이온 교환 수지를 녹차 추출액에 직접 첨가 혼합한 후, 소정 시간 이후에 상기 음이온 교환 수지를 필터를 이용하여 제거할 수도 있다. 이 경우, 적층층을 이용한 제거 방법에 비하여 상대적으로 녹차 추출액과의 접촉 면적 및 시간이 충분하여 음이온 교환 수지를 상기 적층층을 이용한 방식보다 적게 사용 가능하다.

<55> 상기 음이온 교환 수지를 이용한 EGCG, ECG 및 파라치온 제거 방법은 대량생산 체계의 공장 스케일이나 소규모 음료 판매점 및 개인적인 실시인지에 따라 적절히 선택될 수 있다. 예를 들면, 소규모 실시인 경우 건조 녹차 잎으로부터 일차적으로 여과지를 통하여 녹차 추출액을 제조하고 이어서 본 발명에 따른 여과방식을 추가적으로 적용함으로써 기능성 녹차 음료를 제조할 수 있을 것이다.

<56> 상기 음이온교환 수지로서는, 2 내지 6M의 NaOH 용액으로 활성화 시킨 것을 사용하거나 이와 다르게 2 내지 6M의 KOH 용액, 2 내지 6M의 NaCl 용액 및 2 내지 4M KCl 용액 중 적어도 하나의 용액으로 활성화 시킨 것을 사용한다.

<57> C18 비드를 이용한 제거방법

<58> EGCG, ECG 및 파라치온을 제거하기 위한 다른 방법으로서, 고형인 C18 비드가 적층된 여과지 또는 상기 C18 비드가 적층된 관을 통하여 상기 녹차 추출액을 통과시킴으로써, 상기 EGCG 및 파라치온을 선택적으로 제거할 수 있다.

<59> 이와 다르게 상기 C18 비드를 상기 녹차 추출액에 직접 첨가한 후 상기 C18 비드를 여과를 이용하여 제거함으로써 EGCG, ECG 및 파라치온을 제거할 수도 있다.

<60> 상기 C18 비드의 사용량은 상기 녹차 추출액 100 중량부 대비 1 내지 50 중량부인 것이 바람직하다.

<61> 상기 적층의 의미는, 여과지 위에 상기 C18 비드를 단순히 위치시켜 놓은 것까지 포함하는 개념으로서, 상기 C18 비드의 적층에 의한 방식은 주로 상기 녹차 추출액을 수직적으로 유동시켜 여과시키는 공정에 적용하기에 적합하다.

<62> 상기 C18 비드의 처리를 이용한 제거방법으로, 이와 다르게 상기 C18 비드를 녹차 추출액에 직접 첨가 혼합한 후, 소정 시간 이후에 상기 C18 비드를 필터를 이용하여 제거할 수도 있다. 이 경우, 적층을 이용한 제거 방법에 비하여 상대적으로 녹차 추출액과의 접촉 면적 및 시간이 충분하여 C18 비드를 상기 적층을 이용한 방식보다 적게 사용 가능하다.

<63> 상기 C18 비드를 이용한 EGCG, ECG 및 파라치온 제거 방법은 대량생산 체계의 공장 스케일이나 소규모 음료 판매점 및 개인적인 실시인지에 따라 적절히 선택될 수 있다. 예를 들면, 소규모 실시인 경우 건조 녹차 잎으로부터 일차적으로 여과지를 통하여 녹차 추출액을 제조하고 이어서 본 발명에 따른 여과방식을 추가적으로 적용함으로써 기능성 녹차 음료를 제조할 수 있을 것이다.

<64> PEG 비드를 이용한 제거방법

<65> EGCG, ECG 및 파라치온을 제거하기 위한 다른 방법으로서, 고형인 PEG 비드가 적층된 여과지 또는 상기 PEG 비드가 적층된 관을 통하여 상기 녹차 추출액을 통과시킴으로써, 상기 EGCG, ECG 및 파라치온을 선택적으로 제거할 수 있다.

<66> 이와 다르게 상기 PEG 비드를 상기 녹차 추출액에 직접 첨가한 후 상기 PEG 비드를 여과를 이용하여 제거함으로써 EGCG, ECG 및 파라치온을 제거할 수도 있다.

<67> 상기 PEG 비드의 사용량은 상기 녹차 추출액 100 중량부 대비 0.01 내지 50 중량부인 것이 바람직하다.

<68> 상기 적층의 의미는, 여과지 위에 상기 PEG 비드를 단순히 위치시켜 놓은 것까지 포함하는 개념으로서, 상기 PEG 비드의 적층에 의한 방식은 주로 상기 녹차 추출액을 수직적으로 유동시켜 여과시키는 공정에 적용하기에 적합하다.

<69> 상기 PEG 비드의 처리를 이용한 제거방법으로, 이와 다르게 상기 PEG 비드를 녹차 추출액에 직접 첨가 혼합한 후, 소정 시간 이후에 상기 PEG 비드를 필터를 이용하여 제거할 수도 있다. 이 경우, 적층을 이용한 제거 방법에 비하여 상대적으로 녹차 추출액과의 접촉 면적 및 시간이 충분하여 PEG 비드를 상기 적층을 이용한 방식보다 적게 사용 가능하다.

<70> 상기 PEG 비드를 이용한 EGCG, ECG 및 파라치온 제거 방법은 대량생산 체계의 공장 스케일이나 소규모 음료 판매점 및 개인적인 실시인지에 따라 적절히 선택될 수 있다. 예를 들면, 소규모 실시인 경우 건조 녹차 잎으로부터 일차적으로 여과지를 통하여 녹차 추출액을 제조하고 이어서 본 발명에 따른 여과방식을 추가적으로 적용함으로써 기능성 녹차 음료를 제조할 수 있을 것이다. 상기 C18 비드, PEG 비드는 수지 또는 금속 성분 등으로 이루어진 비드의 표면에 각각 C18 및 PEG 성분이 코팅되어 있는 비드를 의미한다. 상기 비드는 녹차 추출액 등에 첨가되어 EGCG, ECG 및 파라치온 등의 목적하는 제거 성분들을 흡착한 후 녹차 추출액으로부터 제거된다. 상기 비드를 이용한 제거 방법은 일반 소비자에 의하여 수행되는 것 보다는 녹차 음료 제조사에 의하여 녹차 음료 제품이 소비자들에게 공급되기 전 대량 생산 체계 하에서 일괄적으로 수행되는 것이 바람직할 것이다.

<71> 이하에서는 상기와 같은 방법 외에, 비드 형태가 아닌 PEG를 직접 녹차 추출액에 첨가 및 혼합함으로써 EGCG, ECG 및 파라치온 등이 체내의 혈관 내로 흡수되지 않도록 하는 방법에 대하여 설명한다. 이처럼, 상기 EGCG, ECG 및 파라치온 성분이 혈관 내로 흡수되지 않고, 전량 체외로 배출되는 경우도 광의적인 의미에서 본 발명의 '제거'로 이해될 수 있겠다. 이하 구체적으로 설명하도록 한다. 상기 PEG는 EGCG, ECG 및 파라치온과 화학적으로 결합하고 있다가 체내에 흡수되지 않고 체외로 배출된다.

<72> mPEG를 이용한 제거방법

<73> EGCG, ECG 및 파라치온을 제거하기 다른 방법으로서, 고형인 mPEG를 상기 녹차 추출액에 첨가하고 교반함으로써 상기 EGCG, ECG 및 파라치온을 선택적으로 제거할 수 있다. 상기 mPEG은 메톡시(methoxy)기를 함유하는 PEG를 의미한다. 한편, 상기 PEG는 평균 분자량이 200 내지 14,000이고 고분자의 일 말단의 히드록시기를 저급 알킬기와 결합시킨 것일 수도 있다. 본 실시예에서, 이러한 안정화 작용기의 예로서 메톡시 기 등을 예시하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

<74> 상기 mPEG의 사용량은 상기 녹차 추출액 100 중량부 대비 0.01 내지 30 중량부인 것이 바람직하다.

<75> 이하에서는 구체적인 실시예들을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명하도록 한다.

<76> [실시예]

<77> [실시예 1] 에틸 아세테이트를 이용한 EGCG, ECG 제거 (1)

<78> 본 실시예에서는 녹차 추출액에 에틸 아세테이트를 혼합한 후 원심분리에 의하여 에틸 아세테이트를 분리함으로써 EGCG, ECG가 제거될 수 있음을 확인하였다.

<79> 녹차 추출액 내의, EGCG, ECG를 비롯한 각각의 카테킨 함량은 0.1% 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid)를 포함한 수성 아세토니트릴(acetonitrile)을 전개액으로 이용하여 HPLC(High Pressure Liquid Chromatography)로 정량하였다. 카테킨의 정량은 알고 있는 농도의 순수 카테킨으로 정량 곡선을 구한 다음 이것을 이용하여 얻었다.

<80> 0.2 g의 건조된 녹차 잎(상품명: 세작, 제조사: 보성녹차명가, 전남)은 10 ml의 물에서 60℃로 5분간 추출하였

다. 추출된 액을 이하, 녹차 추출액이라 한다. 이후 0.45 ㎛ 필터로 걸러 고형 잎 성분을 제거한 후, 10 ml의 에틸 아세테이트를 혼합한 후 60℃에서 5분간 교반하였다. 원심분리로 에틸 아세테이트층을 분리시키고, 물 층만 모아 물층에 존재하는 카테킨의 함량을 분석하였고, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

<81> 처리 전과 처리 후에 녹차 추출액에 함유된 카테킨의 상대적 비율

표 1

<82>

항목	EGC(%)	EC(%)	EGCG(%)	ECG(%)	기타 카테킨(%)	EGCG/EGC
녹차 추출액	32.3 ± 2.9	8.7 ± 0.6	37.5 ± 0.6	6.9 ± 0.8	14.6 ± 1.2	1.16 ± 0.16
에틸 아세테이트 처리 후	54.3 ± 3.2	6.0 ± 0.9	17.9 ± 1.9	3.3 ± 1.9	18.4 ± 4.4	0.33 ± 0.11

<83> 상기 표 1을 참조하면, 에틸 아세테이트 처리 후에 EGCG, ECG 의 함량이 선택적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다.

<84> [비교예 1] 에틸 아세테이트를 이용한 EGCG , ECG 제거 (2)

<85> 0.2 g의 건조된 녹차 잎을 10 ml의 물로 60℃에서 5분간 추출하고, 잎의 고형 성분 제거 없이, 10 ml의 에틸 아세테이트를 혼합한 후, 60 ℃에서 5분간 교반하였다. 원심분리로 에틸 아세테이트층을 분리시켰다. 최종 수용액에 존재하는 카테킨의 함량을 분석하였고 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

<86> 처리 전과 처리 후에 녹차 추출액에 함유된 카테킨의 상대적 비율

표 2

<87>

항목	EGC(%)	EC(%)	EGCG(%)	ECG(%)	기타 카테킨(%)	EGCG/EGC
녹차추출액	32.3 ± 2.9	8.7 ± 0.6	37.5 ± 0.6	6.9 ± 0.8	14.6 ± 1.2	1.16 ± 0.16
에틸 아세테이트 처리 후	39.5 ± 1.9	6.3 ± 0.5	34.2 ± 1.8	3.3 ± 0.8	16.6 ± 0.9	0.87 ± 0.09

<88> 표 2를 참조하면, 녹차 잎 고형분이 존재하는 조건에서는 에틸 아세테이트 처리를 하여도 EGCG의 함량 변화가 거의 나타나지 않았으며, 이는 녹차 잎으로부터 지속적인 EGCG의 공급되기 때문인 것으로 추정된다. 따라서, EGCG의 효과적인 제거를 위해서는 1차적으로 녹차 추출액을 준비하고 녹차 고형분을 제거한 후 에틸 아세테이트를 2차적으로 처리하여야 함을 알 수 있었다.

<89> [실시예 2] CTAB을 이용한 EGCG, ECG 제거 (1)

<90> 0.2 g의 건조된 녹차 잎을 10 ml의 물에서 60℃로 5분간 추출하였다. 이후 0.45 ㎛ 필터로 걸러 잎을 여과한 후, CTAB를 첨가하고60℃에서 5분간 교반하였다. 원심분리로 CATB를 침전시키고, 상등액의 카테킨의 함량을 HPLC를 이용하여 분석하였다.

<91> 상기 첨가량을 각각 5 mg 및 10 mg을 첨가하고 각 경우에 대하여 카테킨 함량을 분석하였고, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

<92> 처리 전과 처리 후에 녹차 추출액에 함유된 카테킨의 상대적 비율

표 3

<93>

항목	EGC(%)	EC(%)	EGCG(%)	ECG(%)	기타 카테킨(%)	EGCG/EGG
녹차추출액*	32.3 ± 2.9	8.7 ± 0.6	37.5 ± 0.6	6.9 ± 0.8	14.6 ± 1.2	1.16 ± 0.16

CTAB 5mg	40.2 ± 1.4	11.1 ± 0.6	25.8 ± 2.0	3.2 ± 0.4	19.7 ± 0.6	0.64 ± 0.07
CTAB 10mg	44.2 ± 4.8	11.7 ± 1.7	19.4 ± 7.5	3.1 ± 2.1	21.6 ± 3.3	0.44 ± 0.23

<94> [실시예 3] 양이온교환 수지를 이용한 EGCG, ECG 제거 (1)

<95> 0.2 g의 건조된 녹차 잎을 10 ml의 물에서 60 ℃로 5분간 추출하였다. 이후 0.45 ㎛ 필터로 녹차 잎을 걸러낸 후, 남은 추출물에 6 M HCl 용액에서 활성화시킨 양이온 교환 수지를 첨가하고 60℃에서 5분간 교반하였다. 상기 양이온 교환 수지는 구체적으로 양이온 교환 수지를 관에 넣고6 M HCl 용액(수지의 20배 volume)을 천천히 흘러주어 활성화 시키고, 비이온수(deionized water)(수지의 20배 부피)로 씻어낸 후 사용하였다. 필터를 이용하여, 수지를 제거한 후, 수용성 추출물내의 카테킨 함량을 HPLC로 정량하였다. 그 결과는 하기 표 4에 나타내었다.

<96> 처리 전과 처리 후에 녹차 추출액에 함유된 카테킨의 상대적 비율

표 4

<97>

항목	EGC(%)	EC(%)	EGCG(%)	ECG(%)	기타 카테킨(%)	EGCG/EGC
녹차 추출액	32.3 ± 2.9	8.7 ± 0.6	37.5 ± 0.6	6.9 ± 0.8	14.6 ± 1.2	1.16 ± 0.16
양이온교환 수지 0.5 g	39.8 ± 1.4	10.7 ± 0.8	30.5 ± 1.8	3.6 ± 2.3	15.4 ± 1.5	0.80 ± 0.12
양이온교환 수지 1.0 g	40.4	9.8	29.8	5.2	14.8	0.70
양이온교환 수지 2.0 g	44.6 ± 7.7	11.3 ± 1.0	26.9 ± 3.0	3.9 ± 2.5	13.3 ± 2.9	0.60 ± 0.16

<98> 표 4를 참조하면, 6M의 HCl로 활성화시킨 양이온교환 수지를 이용할 경우, 유효한 EGCG, ECG 의 감소 효과가 나타났으나 그 효과의 크기가 현저하지 않은 것으로 나타났다.

<99> [실시예 4] 양이온교환 수지를 이용한 EGCG, ECG 제거 (2)

<100> 0.2 g의 건조된 녹차 잎을 10 ml의 물에서 60℃로 5분간 추출하고 0.45 ㎛ 필터로 녹차 잎을 걸러낸 후, 추출물에 6 M NaCl용액, 2.5 M $Ca(O_2CCH_3)$ 용액 또는 3.5 M KCl 용액으로 활성화시킨 1.5 g의 이온교환 수지를 첨가하였다. 이후 60℃에서 5분간 교반하였다. 상기 양이온교환 수지는 각각 6 M NaCl용액(수지의 20배 volume), 2.5 M $Ca(O_2CCH_3)$ 용액(수지의 20배 volume) 그리고 3.5 M KCl 용액(수지의 20배 volume)을 천천히 흘려주어 활성화시키고, 비이온수(deionized water)로 씻어준 후 사용하였다. 교반 후, 필터를 이용하여 수지를 제거하고, HPLC로 수용성 추출물의 카테킨 함량을 HPLC로 측정하였고, 그 결과는 하기 표 5에 나타내었다.

<101> 처리 전과 처리 후에 녹차 추출액에 함유된 카테킨의 상대적 비율

표 5

<102>

	EGC(%)	EC(%)	EGCG(%)	ECG(%)	기타 카테킨(%)	EGCG/EGG
녹차 추출액	32.3 ± 2.9	8.7 ± 0.6	37.5 ± 0.6	6.9 ± 0.8	14.6 ± 1.2	1.16 ± 0.16
6 M NaCl로 활성화	39.0	9.2	17.3	1.3	33.2	0.44
2.5 M $Ca(OAc)_2$ 로 활성화	39.6	9.5	20.9	2.8	27.1	0.53
3.5 M KCl로 활성화	39.4	9.5	16.7	1.6	32.8	0.43

<103> 표 5를 참조하면, 상기 실시예 4에 의한 EGCG, ECG 제거 효과가, 상대적으로 실시예 3에 의한 EGCG 제거 효과에 비하여 우수한 것으로 나타났다.

<104> [실시예 5] PEG 비드를 이용한 EGCG, ECG 제거

<105> 0.2 g의 건조된 녹차 잎을 10 ml의 물에서 60℃로 5분간 추출하고 0.45 ㎛ 필터로 녹차 잎을 걸러낸 후, 추출물에0.1 g의 PEG 비드를 첨가하였다. 이후 60℃에서 5분간 교반하였다. 교반 후, 필터를 이용하여 수지를 제거하고, HPLC로 수용성 추출물의 카테킨 함량을 HPLC로 측정하였고, 그 결과는 하기 표 6에 나타내었다.

<106> 처리 전과 처리 후에 녹차 추출액에 함유된 카테킨의 상대적 비율

표 6

<107>

항목	EGC(%)	EC(%)	EGCG(%)	ECG(%)	기타 카테킨(%)	EGCG/EGG
녹차 추출액*	32.3 ± 2.9	8.7 ± 0.6	37.5 ± 0.6	6.9 ± 0.8	14.6 ± 1.2	1.16 ± 0.16
0.1g PEG bead 처리 후	37	10	1	<1	52	0.03

<108> [실시예 6] mPEG를 이용한 EGCG, ECG 제거

<109> 30 g의 건조된 녹차 잎을 500 ml의 물에서 80℃로 3분간 추출하고 0.45 ㎛ 필터로 녹차 잎을 걸러낸 후, 추출물에7.6 g의 mPEG를 첨가하였다. 이후 상온에서 2분간 섞어주었다. 이 용액을 사람이 마신 후 혈액내의 글루코오스양을 측정하여 EGCG의 인체 흡수를 간접적으로 판단하였다. 도 1은 공복 흰쥐 체중(kg)당 각 에피카테킨(epicatechin) 10 mg을 정맥주사하고 30분후에 복막내로 포도당(2g/kg체중)을 주입하고 시간에 따라 측정한 혈중 포도당 농도를 관찰한 그래프이다. EGCG 및 ECG 투여군에서 더 높은 혈당값이 관찰되었다. 즉, 녹차에 의한 혈중 글루코오스양 증가는 녹차의 EGCG와 ECG에 의한 것으로 실험 결과 밝혀졌다. 도 2는 공복 정상 성인 남자에서 경구로 녹차추출액(350 ml, EGCG함량 약 680 mg)을 투여한 한 시간 후 경구 포도당(75g/150ml)을 복용하게 하고 시간에 따라 측정한 혈당 검사 결과를 나타낸 그래프이다. PEG군은 녹차 추출액과 함께 0.42 mM 또는 0.23 mM의 PEG를 함께 복용하였다. 도 2를 참조하면, mPEG로 처리한 녹차에 의한 혈중 글루코오스양이 처리하지 않은 녹차의 양보다 작은 것은 EGCG와 ECG가 mPEG의 처리로 흡수되지 않았음을 확인할 수 있었다.

<110> 한편, 도 3은 지방세포주, 근육세포주 및 간세포주에서 포도당 섭취율을 관찰한 그래프이다. 투여된 EGCG의 농도에 의존하여 기저 및 인슐린 자극에 의한 포도당 섭취율이 감소하는 것이 관찰되었다.

<111> 도 4는 공복 흰쥐 체중(kg)당 녹차군은 녹차추출액 동결건조분말 100 mg (10 mg EGCG)을, PEG군은 동일 녹차추출액에 PEG로 전처치 한후 동결건조된 분말 100 mg을 정맥주사한 30분후 복막내로 포도당(2g/kg체중)을 주입하고 시간에 따라 혈중 포도당 농도를 측정한 그래프이다. PEG 군에서 대조군과 비슷한 혈당값이 관찰되었다.

<112> 파라치온 제거 효과 입증 실험

<113> 1. 실험 방법

<114> (1) 녹차 잎에 존재하는 파라치온의 검출

<115> 건조된 녹차 잎 0.2g을 100℃의 물 10 ml에 넣고 상온에서 10분간 저어주었다. 10분 후 녹차 잎을 필터하여 제거한 후 용출된 파라치온의 양을 HPLC로 분석 하였다.

<116> (2) 파라치온을 추출법으로 제거

<117> 시판하는 파라치온(17%)을 메탄올(삼전화학 제조, 한국)로 100배 희석하여 기준용액으로 사용하였다. 기준용액을 메탄올로 100배 희석하여 만든 용액을 HPLC로 분석하였다. 기준용액 100 ul를9.9 ml의 물에 가하여 100배 희석한 용액 10ul를 취하여 HPLC로 분석하였다. 물로 희석된 용액에 10m의 에틸 아세테이트를 첨가하고 20분간 교반시켜 주었다. 원심분리기로 에틸 아세테이트층과 물층을 분리한 다음, 물층과 에틸아세테이트층에 있는 파라치온의 양을 HPLC로 각각 조사하였다.

<118> (3) 파라치온을 흡착법으로 제거

<119> 시판하는 파라치온(17%)을 메탄올로 100배 희석하여 기준용액으로 사용하였다. 기준용액 100 ul를9.9 ml의 물

에 첨가하여 만들어진 수용액을 HPLC로 분석하였다.

<120> 상기 수용액에 활성화된 양이온교환수지 1g을 가한 후 5분간 교반하였다. 양이온교환수지를 필터로 제거한 다음 수용액에 잔존하는 파라치온의 양을 HPLC로 조사하였다.

<121> 상기 수용액에 활성화된 양이온교환수지 2g을 가한 후 5분간 교반하였다. 양이온교환수지를 필터로 제거한 다음 수용액에 잔존하는 파라치온의 양을 HPLC로 조사하였다.

<122> 상기 수용액에 활성화된 C18 비드0.4g을 가한 후 5분간 교반하였다. C18 비드를 필터로 제거한 다음 수용액에 잔존하는 파라치온의 양을 HPLC로 조사하였다.

<123> 2. 실험 결과

<124> (1) 녹차 잎에 존재하는 파라치온의 검출

<125> 녹차 0.2g/10ml에서 검출, 추출된 파라치온에 대한 자료가 도5에 나타나있다. 도 5는 녹차 0.2g/10ml에 잔존하는 파라치온의 양을 보여주는 HPLC 그래프이다. 도 5에서 검은색 라인은 파라치온 0.17mg/L에 대한 것이고, 파란색 라인은 녹차 추출액에 대한 것이다.

<126> 녹차 추출물에서 파라치온과 동일한 지연 시간(retention time)을 가지는 물질이 검출되었다. 이 물질에 대한 정확한 구조 규명은 다른 분석장비를 통한 조사가 필요하지만, 이 물질을 파라치온이라 가정했을 때 그 양은 0.17mg/L 보다는 적은 것으로 나타났다. 그러나 일반적인 녹차 1잔이 2g/100ml인 것을 감안하면, 녹차 1잔으로 섭취하는 파라치온의 양이 FDA규정 일일 섭취허용량 (0.02mg/kg/day) 과 비슷한 것으로 나타났다.

<127> (2) 파라치온을 추출법으로 제거

<128> 물에 녹아 있는 파라치온을 에틸 아세테이트로 용출하여 제거시킨 결과가 도 6에 나타나 있다. 도6은 에틸 아세테이트를 사용한 방법에 따른 파라치온의 양적 변화를 보여주는 HPLC 그래프이다. 도 6에서 검은색 라인은 에틸 아세테이트로 처리하기 이전 수용액에 관한 것이고, 하늘색 라인은 에틸 아세테이트로 처리한 이후의 에틸 아세테이트 층에 관한 것이고, 적색 라인은 에틸 아세테이트로 처리한 이후의 수용액에 관한 것이다. 녹차 추출액 중의 파라치온은 에틸 아세테이트를 이용한 단회의 추출로도 90% 이상 제거되는 것으로 나타났다.

<129>

<130> (3) 파라치온을 흡착법으로 제거

<131> 물에 녹아 있는 파라치온을 이온교환수지에 흡착시켜 제거시킨 결과가 도 7과 8에 나타나 있다.

<132> 도7은 사용한 양이온 교환 수지의 양에 따른 파라치온의 양적 변화를 보여주는 HPLC 그래프이다.

<133> 수용액중의 파라치온의 양은 사용한 이온교환수지의 양에 비례하여 감소하였다. (파라치온 수용액: 분홍색 선, 이온교환 수지 1g으로 처리한 용액: 하늘색선, 이온교환 수지 2g으로 처리한 용액: 검정 선).

<134> 도8은 사용한C18 비드의 사용에 따른 파라치온의 양적 변화를 보여주는 HPLC 그래프이다.

<135> 수용액중의 파라치온의 양은 C18 비드의 첨가로 감소하였다. (파라치온 수용액: 검정 선, C18 비드0.4 g으로 처리한 용액: 하늘색선).

<136> 본 발명은 한편, 상술한 방법들을 적용하여 제조된 녹차 음료를 제공한다. 본 발명에 따른 녹차 음료는 녹차 수(水) 추출액 100 중량부, 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 0.1 내지 30 중량부를 포함한다.

<137> 상기 PEG는 메톡시 기 등의 안정화 작용기를 포함한다. 상기 PEG의 함량이 녹차 추출액 100 중량비 대비 0.1 미만이면 목적하는 성분의 제거 효과가 현저히 저하되고, , 반면에 상기 PEG의 함량이 30을 초과하면 녹차 음료 등의 점성이 증가되어 음용감이 저하되는 문제가 있다.

<138> 상기 PEG는 ECGC, EGC 및 파라치온과 결합한 상태로 체내를 위장관을 거쳐 그대로 체외로 배출된다.

<139> 상기 PEG는 녹차 음료의 제조 과정에서 혼합되는 것 보다는, 예를 들면 녹차 음료 용기에 별도로PEG를 포함시켜 제품화하고, 음료를 마시는 소비자가 음료를 먹기 전에 PEG를 음료에 첨가하여 먹도록 하는 것이 바람직하다. PEG가 녹차 음료의 제조 과정 중에 포함될 경우 침전물을 형성시킬 수 있기 때문이다.

<140> 본 발명은 또한 상술한 방법들을 적용하여 제조된 분말 녹차를 제공한다. 상기 분말 녹차는 분말 자체 또는 물에 녹이거나 분산시켜 복용 가능하다. 상기 분말 녹차는 녹차 추출액을 동결 건조 하여 수득되거나 건조된 녹차

잎을 분쇄하여 준비된 녹차 고형분 100 중량부, 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 0.1 내지 50 중량부를 포함한다.

<141> 상기 PEG의 함량이 상기 녹차 고형분 100 중량부 대비 0.1 미만이면 목적하는 성분의 제거 효과가 현저히 저하되는 문제가 있고, 반면에 상기 PEG의 함량이 50을 초과하면 사용량 대비 효과의 측면에서 효율이 저하되는 문제가 있다.

<142> 상기 분말 녹차는 녹차 추출액을 에틸 아세테이트, 세틸트리메틸암모늄브로마이드 (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB), 양이온 교환 수지, 음이온 교환 수지, C18 비드 및 PEG 비드 중 적어도 하나의 성분으로 처리하여 녹차로부터 에피갈로카테킨 갈레이트 (epigallocatechin gallate, EGCG), 에피카테킨 갈레이트 (epicatechin gallate, ECG) 및 파라치온(parathion)을 제거하는 단계, 및 에피갈로카테킨 갈레이트 (epigallocatechin gallate, EGCG), 에피카테킨 갈레이트 (epicatechin gallate, ECG) 및 파라치온(parathion)이 제거된 녹차 추출액을 동결 건조하여 분말화 하는 단계에 의하여 제조될 수 있다.

산업이용 가능성

<143> 본 발명에 따르면, 녹차 추출액으로부터 EGCG와 ECG 및 파라치온을 선택적이고 효과적으로 제거할 수 있다. 따라서, 본 발명자의 연구와 연계하여 생각하면 당뇨 에 취약한 사람들에게 적합한 녹차 음료 및 분말의 개발이 가능하다. 또한 녹차 잎을 이용하여 녹차를 만들어 마실 때 본 발명의 방법을 이용함으로써 당뇨 에 취약한 사람들이 자유롭게 녹차를 음용할 수 있게 된다. 아울러, 녹차 추출액으로부터 유해 농약성분인 파라치온을 효과적으로 제거할 수 있기 때문에 보다 안전한 녹차 음료의 개발이 가능하다.

<144> 결국, 본 발명을 산업분야에 적용할 경우, 국민 건강에 유익한 기능성 음료 또는 식품을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

<145> 도 1은 공복 흰쥐 체중(kg)당 각 epicatechin 10 mg을 정맥주사한 30분후 복막내로 포도당(2g/kg체중)을 주입하고 시간에 따라 측정한 혈중 포도당 농도의 변화를 나타낸 그래프이다.

<146> 도 2는 공복 정상 성인 남자에서 경구로 녹차추출액(350 ml, EGCG함량 약 680 mg)을 투여한 한시간후 경구 포도당(75g/150ml)을 복용케하고 시간에 따라 측정한 혈당 검사 결과를 나타낸 그래프이다.

<147> 도 3은 지방세포주, 근육세포주 및 간세포주에서 포도당 섭취율을 관찰한 그래프이다.

<148> 도 4는 공복 흰쥐 체중(kg)당 녹차군은 녹차추출액 동결건조분말 100 mg (10 mg EGCG)을, PEG군은 동일 녹차추출액에 PEG로 전처치 한후 동결건조된 분말 100 mg을 정맥주사한 30분후 복막내로 포도당(2g/kg체중)을 주입하고 시간에 따라 혈중 포도당 농도를 관찰한 그래프이다.

<149> 도 5는 녹차 0.2g/10ml에서 검출된 파라치온을 보여주는 HPLC 그래프이다.

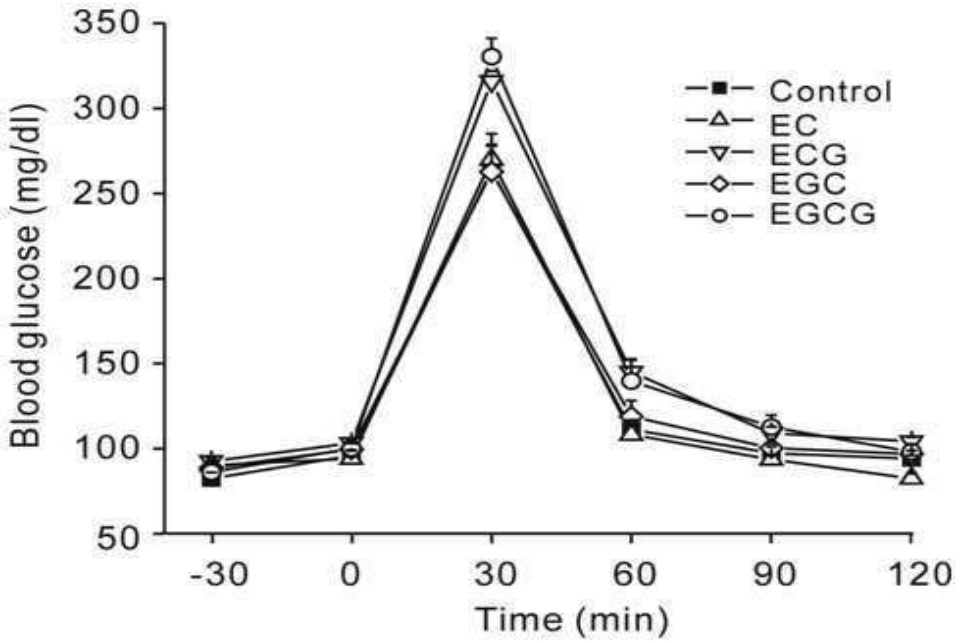
<150> 도 6은 에틸 아세테이트를 사용한 방법에 따른 파라치온의 양적 변화를 보여주는 HPLC 그래프이다.

<151> 도 7은 양이온 교환수지를 사용한 방법에 따른 파라치온의 양적 변화를 보여주는 또 다른 HPLC 그래프이다.

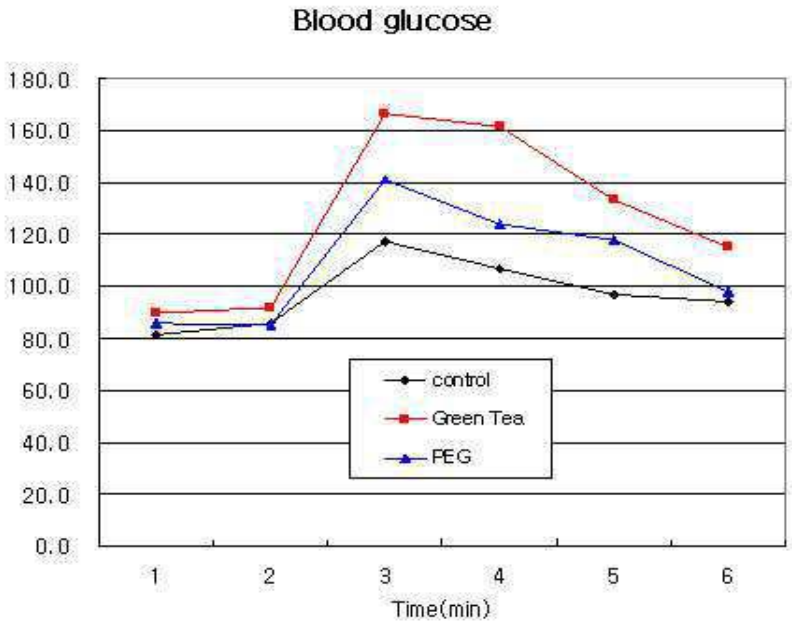
<152> 도 8은 C18 비드를 사용한 방법에 따른 파라치온의 양적 변화를 보여주는 HPLC 그래프이다.

도면

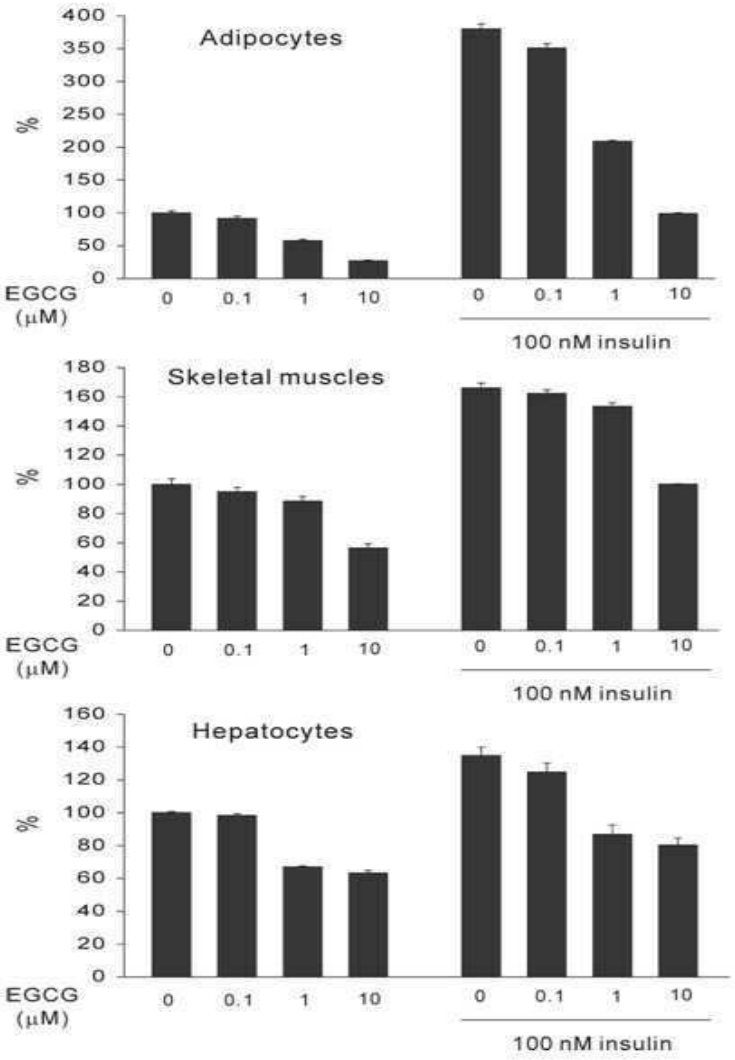
도면1


Blood glucose (mg/dl)
350
300
250
200
150
100
50
-30
0
30
60
90
120
Time (min)
Control
EC
ECG
EGC
EGCG

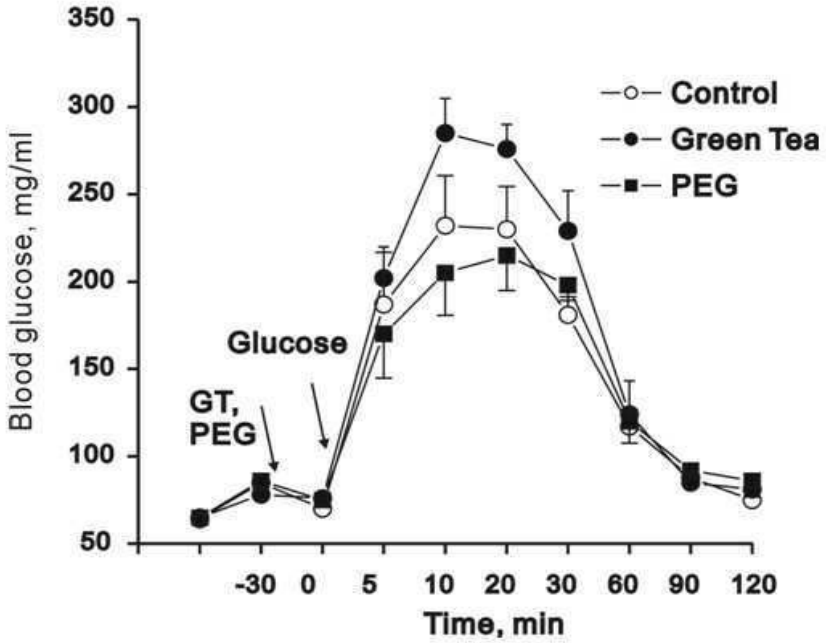
도면2


Blood glucose
180.0
160.0
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
1
2
3
4
5
6
Time(min)
control
Green Tea
PEG

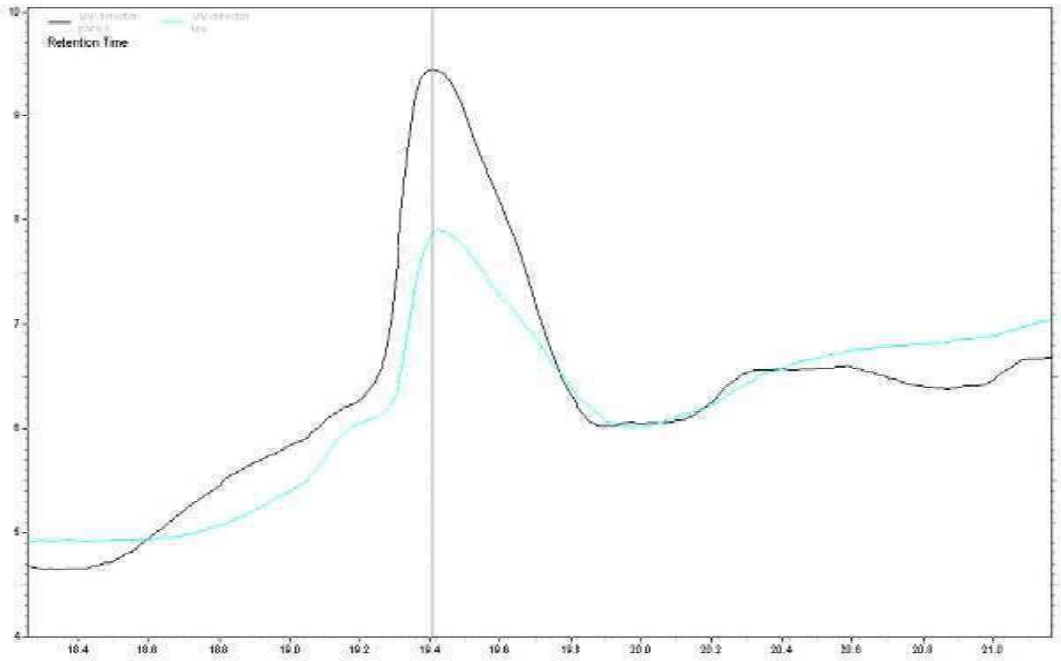
도면3


Adipocytes
%
400
350
300
250
200
150
100
50
0
EGCG
(μM)
0
0.1
1
10
0
0.1
1
10
100 nM insulin
Skeletal muscles
%
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
EGCG
(μM)
0
0.1
1
10
0
0.1
1
10
100 nM insulin
Hepatocytes
%
160
140
120
100
80
60
40
20
0
EGCG
(μM)
0
0.1
1
10
0
0.1
1
10
100 nM insulin

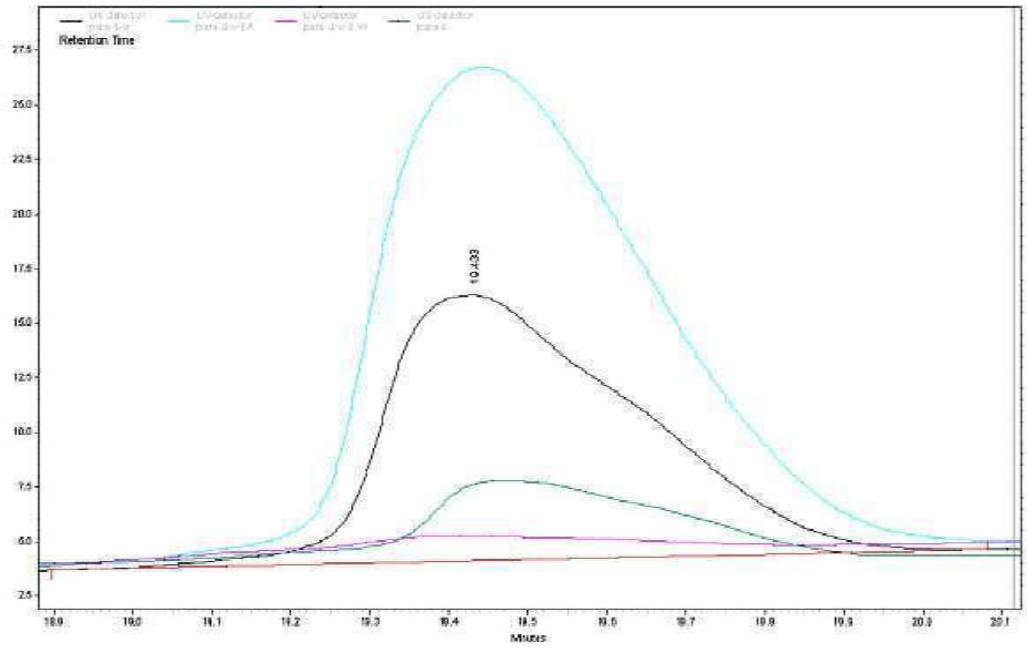
도면4


Blood glucose, mg/ml
350
300
250
200
150
100
50
Control
Green Tea
PEG
Glucose
GT,
PEG
-30
0
5
10
20
30
60
90
120
Time, min

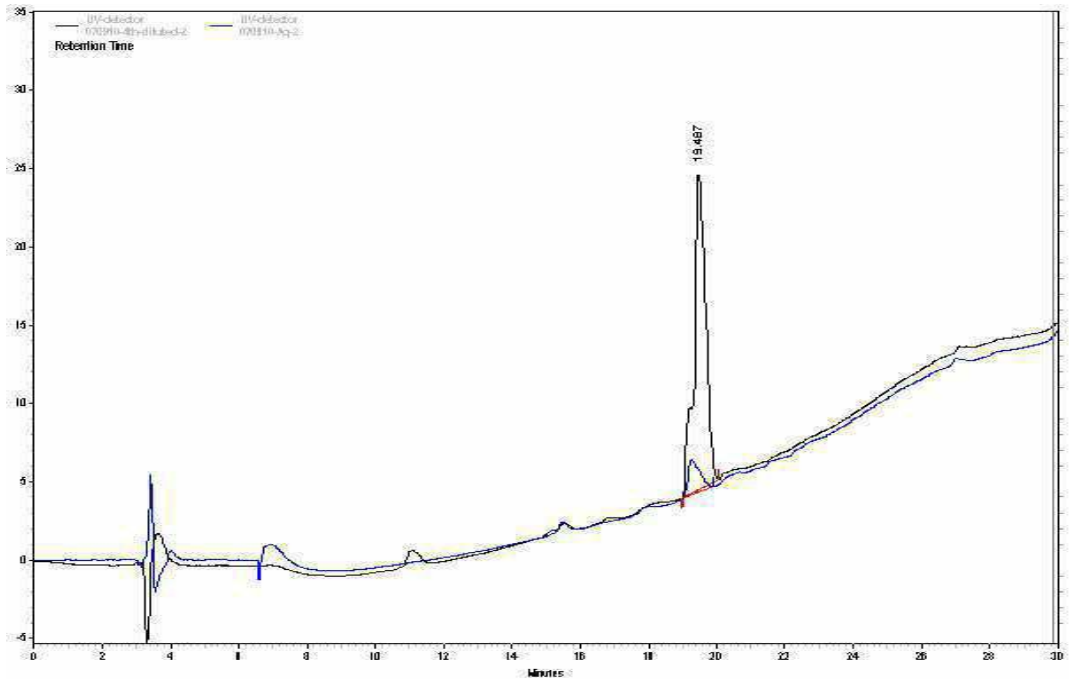
도면5


Retention Time

도면6


Retention Time
10.439
Minutes

도면7


Retention Time
19.487
Minutes

도면8

