

초임계이산화탄소를 이용한 탈카페인녹차 열수추출물의 포유동물 세포주를 이용한 염색체이상시험

구윤창¹ · 이현순¹ · 박병규¹ · 김은진¹ · 이선주¹ · 김경현¹ · 김영석² · 정영신³ · 이광원¹

¹고려대학교 생명환경과학대학 식품과학부

²이화여자대학교 생활환경대학 식품영양학과

³Medvill. Co., LTD

Chromosome Aberration Test of Water Extract of Decaffeinated Green Tea using Supercritical Carbon Dioxide with Mammalian cell line

Yun-chang Koo¹, Hyun-sun Lee¹, Byung-gyu Park¹, Eun-jin Kim¹, Sun-joo Lee¹, Kyoung Hoen Kim¹,
Young Suk Kim², Young-shin Chung³, Kwang-won Lee¹

¹Department of food science and technology, College of Life science and biotechnology,
Korea university, Seoul 136-701, Korea

²Department of Food and Nutritional Sciences, Division of Human Ecology,
Ewha womans University, Seoul, 120-750, Korea

³432-10, Pyungchang Dong, Jongro Gu, Seoul 110-848, Korea

(Received November 10, 2006 / Accepted December 15, 2006)

ABSTRACT : There are 10~30% polyphenol and 2~4% caffeine in green tea. Caffeine is a kind of alkaloid containing nitrogen which cause stimulation, impatience, headache, insomnia, low birth weight infant. Because of these negative effect, decaffeinated beverage came out and decaffeinated coffee already have a big market since 1970s. Having proving the physiologic functions of green tea, high consumption of coffee is shifting to green tea. Because of the carcinogenic effect of the organic solvents, decaffeine processing with supercritical carbon dioxide has industrialized and have an advantage in environment-friendly and minimized flavor loss. Decaffeinated green tea using supercritical carbon dioxide is considered to be safe but there are not enough study. We investigated the chromosome aberration test with mammalian cell line, CHL. When the cells were treated with 5000, 2000, 1000 µg/ml and compared with the negative controls, there were no significant ($P > 0.05$) increased chromosome aberration. Same results was observed when adding S9 mixture or not. As a result, water extract of decaffeinated green tea using supercritical carbon dioxide does not induce chromosome aberration.

Key words : Decaffeinated green tea, Supercritical carbon dioxide, Chromosome aberration test

서 론

차는 세계적으로 가장 많이 소비되는 음료 중 하나이다. 그 중에서도 *Camellia sinensis*라는 차나무의 잎을 뒤어 만든 것을 녹차라고 하며 생리활성이 뛰어나다고 알려져 있는 polyphenolic catechin의 함량이 특히 높다 (Alessandra G *et al.*, 2006). 카테킨은 차에 함유되어있는 폴리페놀성분으로서 항산화작용, 혈중콜레스테롤 억제작용, 항암효과, 충치

예방, 소취기능 등의 작용을 한다. 이러한 카테킨 중에서도 특히 EGCG의 함량이 가장 높으며 동시에 최근 주목되고 있는 성분이다. 카테킨은 웰빙분과 더불어 다양하게 이용되고 있는데 대표적으로 건강보조식품, 화장품 등의 원료로 이용되고 있다. 카페인 (trimethylxanthine)은 커피, 차, 구아나라, 카카오 등의 식물에 존재하는 질소함유 알칼로이드의 한 종류로서 중추신경, 심장, 혈관, 신장 등을 자극하는 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있다 (Margriet Westerterp-Plantenga, *et al.*, 2006). 카페인은 위와 같은 긍정적인 효과와 더불어 자극, 흥분, 초조, 두통, 불면, 산모의 저체중아

*To whom correspondence should be addressed

출산 등의 부정적인 효과로 인해 그 섭취를 제한하고자 탈카페인 음료제품이 등장하게 되었다. 녹차엽에는 전체 중량 기준 10~30%의 polyphenol 성분과 2~4%의 카페인 함유되어 있다 (Ping Li *et al.*, 2005).

카페인 성인은 비해서 해독속도가 현저하게 느린 유아와 어린이, 그리고 임신부나 노약자에게 해로운 영향을 끼칠 수 있다. 태아기의 모든 형성 단계에서의 기형도 카페인에 의한 것일 수 있고 (Nawrot, P. *et al.*, 2003), 특히 어린이의 경우 카페인을 많이 섭취하게 되면 학습능력에 악영향을 미칠 수 있다. 임신부가 카페인이 함유된 식품을 과다 섭취하면 저체중 아이를 출산할 가능성이 높다. 따라서 어린이, 임신부, 노약자 등은 카페인의 섭취량을 제한할 필요가 있다. 1970년대 이후 탈카페인 커피의 수요가 급증하여 1999년 미국기준으로 전체 커피소비량의 23%를 탈카페인 커피가 차지하며 40억 달러의 시장을 형성하고 있어 (Ashihara, H. and A. Crozier, 2001) 카페인 함량을 낮춘 음료시장이 크다는 것을 알 수 있다.

세계의 녹차 생산량을 살펴보면 중국은 연간 422천 톤의 녹차를 생산하며 전체 생산량의 71%를 차지하는 세계 최대 녹차 생산국이다. 그 다음이 일본 (88.7천 톤), 인도네시아 (30천 톤), 베트남 (29.6천 톤), 인도 (8.3천 톤)의 녹차를 생산하고 있다 (김종태, 2000). 녹차의 생리활성에 관한 연구가 활발히 진행됨에 따라 미국이나 유럽지역에서도 녹차의 소비가 급격한 증가추세를 보이고 있고, 기존의 영연방 국가나 회교국가 중심에서 커피를 주로 마시는 국가로 소비가 확대되고 있는 중이다 (김종태, 2000).

차로부터 카페인을 없애고자 하는 노력은 지속적으로 이루어져왔으며 chloroform이나 methylene chloride 등의 유기용매가 카페인을 제거하는데 효과적이지만 유기용매가 완전히 제거되지 않고 인체로 흡수될 경우 신경, 호흡기, 소화기 및 각종 장기에 장해를 일으킬 수 있으며 그 독성으로 인하여 소비자들이 기피하였다 (Sakanaka, S., 2003). 따라서 ethyl acetate나 초임계이산화탄소를 이용한 방법이 산업화되었으며, 특히 초임계이산화탄소를 이용한 탈카페인공정은 환경친화성, 향기성분의 손실 최소화 등의 장점으로 점차 이용도가 증가하고 있다. 더구나 녹차엽의 탈카페인공정개발에 대한 연구사례는 거의 없으며 더욱이 초임계 추출법에 대한 안전성에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구진은 초임계이산화탄소를 이용한 탈카페인 녹차의 안전성을 확인하기 위하여 탈카페인 녹차 열수추출물을 포유동물 세포주 (Chinese hamster lung fibroblast)에 노출시켜 염색체이상 빈도를 측정함으로써 시험물질의 유전독성을 평가하였다.

재료 및 방법

시험물질

고려대학교 식품생물공정 실험실에서 생산된 탈카페인 녹차를 열수추출하여 얻은 연갈색 분말을 차광상태로 냉장보관하였으며 실험실시 당일 필요한 시료의 질량을 정확히 측정하여 고압멸균 후 세포배양액에 용해시켜 여과하여 사용하였다.

세포 및 배양조건

염색체 이상 시험에 광범위하게 사용되고 있어 기초자료가 풍부한 Chinese hamster lung fibroblast (CHL)을 ATCC (American Type Culture Collection)를 통하여 분양받아 사용하였다. CHL cell은 Eagle's minimal essential medium (EMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% antibiotic 용액 (Streptomycin/Penicillin)을 첨가하여 배양액으로 사용하였고 포화습도 하에서 5% CO₂를 공급하는 37°C 배양기에서 배양하였다.

시험물질 및 대조물질

탈카페인 녹차 열수추출물은 세포배양액에 녹여 1%의 비율로 첨가하여 실험하였다. Mytomycin C (MMC)는 S9 무첨가 군에서, Cyclophosphamide (CP)는 S9 첨가군에서 양성대조물질로 사용하였으며 MMC와 CP는 모두 세포배양액에 녹여 사용하였다. MMC는 1 µg/ml의 농도로 처리하였고 CP는 10 µg/ml의 농도로 처리하여 사용하였다.

시험방법

염색체 이상 시험은 OECD와 Ishidate & Odashima (1977)의 방법을 조금 변형한 방법을 사용하였다.

검체는 다음과 같은 방법으로 제작하였다. CHL 세포를 60 mm의 petri-dish에 5 × 10⁴ cell/5 ml가 되도록 분주하고 단층세포를 만든 다음, 각각 음성대조물질, 시험물질 및 양성대조물질을 함유하는 배양액으로 교환하여 6시간 배양한 후 신선한 배지로 교환하여 총 배양시간이 24시간이 되도록 하였다. S9 혼합물을 처리한 경우에는 S9 혼합물을 포함한 배양액과 시험물질 또는 양성대조물질을 혼합하여 각각 처리하였다. 각 petri-dish에 세포를 수거하기 2시간 전에 0.25 µg/ml의 Colcemid를 처리한 다음 세포를 수거하여 검체를 제작하였다. 24시간 연속배양을 위한 검체는 CHL세포를 60 mm의 petri-dish에 5 × 10⁴ cell/5 ml가 되도록 분주하고 배양하여 단층세포를 만든 다음, 각각 음성대조물질, 시험물질 또는 양성대조물질이 포함된 배양액으로 24시간 동안 배양하였다. 세포를 수거하기 2시간 전에 0.25 µg/ml의 Colcemid를 처리한 다음 세포를 수거하여 검체를 제작하였다.

검체는 처리 종료 시각에 각 petri-dish로부터 배양액을 제거하고 PBS (Phosphate buffered saline)로 세척한 후 0.005% Trypsin EDTA로 세포를 수거하였다. 수거한 세포를 75 mM KCl 용액 7 ml에 현탁시켜 37°C에서 30분간 처리한 후 냉각고정액 (Methyl alcohol:Glacial acetic acid = 3:1)을 1 ml 혼합하여 10분간 고정하였다. 5 ml의 고정액으로 3회 고정시킨 후 공기건조법으로 검체를 제작하고 5% Giemsa 염색액으로 10분간 염색하여 탈 이온수로 2-3회 씻은 후 건조하였다. 각 군 당 염색상태가 양호한 검체를 선택하여 현미경으로 관찰하였다.

위의 방법으로 제작된 검체를 현미경하에서 1000배의 배율로 관찰하였다. 각 검체 당 200개의 세포분열 중기상세포를 관찰하여 염색체 구조이상 (Structural aberration)과 수적이상 (Numerical aberration) 유무를 관찰하였다. 구조이상은 염색분체형 (Chromatid type)과 염색체형 (Chromosome type)으로 구분하여 계수하였다.

구조이상 (Structural aberration)	숫적이상 (Numerical aberration)
염색분체형 gap (ctg)	배수체 (polyploid)
염색분체형 절단 break (ctb)	핵내변환 (endoreduplication)
염색분체형 교환 exchange (cte)	
염색체형 gap (csg)	
염색체형 절단 break (csb)	
염색체형 교환 exchange (cse)	

결과의 판정은 200개의 중기 분열상을 관찰한 후 염색체 이상을 가진 세포의 출현율을 계산하여 대조군에 비해 유의성 있게 증가한 경우를 양성으로 판정하였으며, $P \leq 0.05$ 의 유의 수준에서 Fisher's exact test를 이용하여 통계처리 하였다.

결론 및 고찰

카페인을 중추신경, 심장, 혈관, 신장 등을 자극하는 긍정적인 효과를 가지고 있는 반면 자극, 흥분, 초조, 두통, 불면, 산모의 저체중아 출산 등의 부정적인 효과로 인하여 커피와 같은 대표적인 카페인 함유음료로부터 카페인을 제거하는 것에 대한 연구는 오래 전부터 지속되어왔다. 최근 건강기능식품에 대한 관심이 높아지면서 생리활성을 가지고 있는 식품에 대해서 연구가 많이 되었으며 녹차의 생리활성에 관한 연구가 활발히 진행됨에 따라 미국이나 유럽지역에서도 녹차의 소비가 급격한 증가추세를 보이고 있다. 녹차에는 생리활성을 나타내는 카테킨과 함께 커피와 마찬가지로 카페인을 함유하고 있다. 커피와 마찬가지로 차에서 카페인을 제거하고자 하는 노력은 지속적으로 이루어져 왔으나 기존의 유

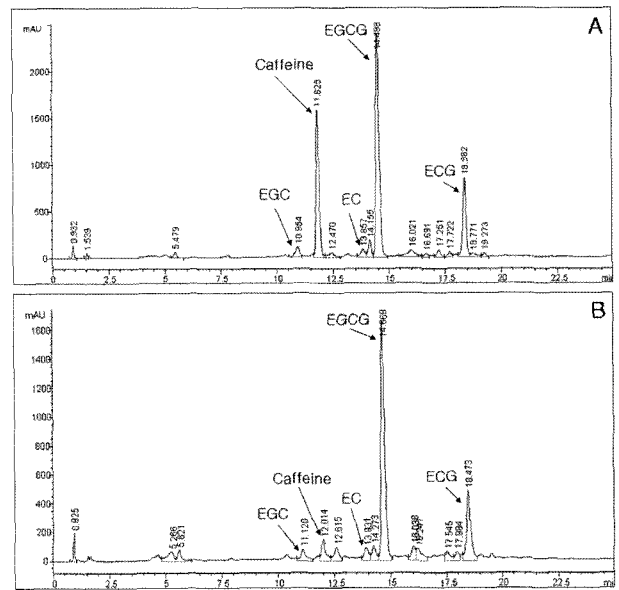


Fig. 1. HPLC profiles and composition of green tea and decaffeinated green tea. Content of EGCG (epigallocatechin gallate), EGC (epigallocatechin), EC (epicatechin), ECG (epicatechin gallate) in water extract of green tea and decaffeinated green tea using supercritical carbon dioxide was analyzed with HPLC. The content of EGCG, EGC, EC, ECG in decaffeinated green tea was about half of green tea.

기용매를 사용하는 방법은 신경, 호흡기, 소화기 및 각종 장기에 장해를 일으킬 수 있다는 위험성을 안고 있기 때문에 인체에 무해하다고 알려져 있으며 친환경적이고 향기성분의 손실을 최소화 할 수 있다는 장점을 가지고 있는 초임계 이산화탄소를 이용한 탈카페인법이 새롭게 주목받고 있다.

본 연구진이 초임계 이산화탄소를 이용하여 제조한 탈카페인 녹차는 기존의 녹차에 비해서 카페인을 93%까지 제거할 수 있었다. 녹차 및 탈카페인녹차의 caffeine, EGCG, EGC, EC, ECG에 대한 성분분석을 decaffeine 정도에 따라 HPLC로 수행하였다. Decaffeine을 하지 않은 녹차의 경우에 caffeine과 catechin 성분의 합을 100%로 보았을 때 caffeine이 13.7%의 함량비를 가지고 있었던 것에 비해서 decaffeine 된 녹차의 경우 2.2% 정도로 줄어들었으며 반대로 EGCG의 함량비는 decaffeine을 하지 않았을 경우 48.2%에서 decaffeine 후 57%로 증가하였다. EGC, EC, ECG도 근소하지만 함량비가 증가하는 결과를 얻었다 (Fig. 1).

초임계추출법에 의해 디카페인 된 녹차 추출물을 100에서 5000 µg/ml까지 7개 농도에서 용량 결정시험을 실시하여 S9 무첨가군과 S9 첨가군에서 각각 세포분열을 50% 억제하는 농도를 최고 농도로 설정하여 실험을 실시하였다. 최고농도인 5000 µg/ml에서도 50% 이상의 세포가 생존했기 때문에 5000 µg/ml을 최고농도로 설정하였다.

Table 1. Summary of results obtained from chromosome aberration test of decaffeine green tea water extract-6 hr treatment

Compound	Dose (µg/ml)	S9 mix	Time (hr) ¹⁾	Aberrated cells(%) ²⁾	
				(-g)	(+g)
NC	0	+		0.5	1.0
Decaffeine green tea extract	5000	+		1.0	2.0
	2000	+	6	0.5	1.0
	1000	+		0.5	1.5
CP	10	+		51.0*	52.5
NC	0	-		0.0	0.5
Decaffeine green tea extract	5000	-		1.0	1.0
	2000	-	6	0.5	1.0
	1000	-		0.5	1.0
MMC	1	-		43.0*	44.5

NC, EMEM media; CP, Cyclophosphamide; MMC, Mytomycin C.

¹⁾ Treatment time.

²⁾ -g, number or % of cells with chromosome aberrations; +g, number or % of cells with chromosome aberrations + number or % of cells with gaps

* Significantly greater than the corresponding vehicle control, $p < 0.001$.

S9 혼합물과 함께 시험물질을 5000, 2000, 1000 µg/ml의 농도로 6시간 동안 처리한 경우, 200개 중기상세포 중 염색체의 구조적 이상 빈도는 1.0, 0.5, 0.5%로 음성대조군과 비교하였을 때 통계적 (Fisher's exact test)으로 유의한 ($P > 0.05$) 증가를 나타내지 않았다. S9 혼합물을 첨가하지 않고 시험물질을 5000, 2000, 1000 µg/ml의 농도로 6시간 동안 처리한 경우에도 염색체의 구조적 이상빈도는 1.0, 0.5, 0.5%로 통계적으로 유의한 ($P > 0.05$) 증가를 나타내지

Table 2. Summary of results obtained from chromosome aberration test of Decaffeine green tea water extract-24 hr treatment

Compound	Dose (µg/ml)	S9 mix	Time (hr) ¹⁾	Aberrated cells(%) ²⁾	
				(-g)	(+g)
NC	0	-		0.5	1.0
Decaffeine green tea extract	5000	-		1.0	1.5
	2000	-	24	0.5	1.0
	1000	-		0.5	1.0
MMC	1	-		50.0*	52.5

NC, EMEM media; MMC, Mytomycin C.

¹⁾ Treatment time.

²⁾ -g, number or % of cells with chromosome aberrations; +g, number or % of cells with chromosome aberrations + number or % of cells with gaps

* Significantly greater than the corresponding vehicle control, $p < 0.001$.

않았다. S9 혼합물과 함께 처리한 양성대조물질 (CP)은 51.0%, S9 혼합물을 첨가하지 않은 양성대조물질 (MMC)도 43.0%로서 현저한 염색체 이상을 유발하였다 (각각 $P < 0.001$). (Table 1) 실험조건에 따른 염색체 이상의 종류는 Table 3에 기록하였다.

S9 혼합물을 첨가하지 않고 시험물질을 24시간 동안 연속 처리한 경우도 5000, 2000, 1000 µg/ml의 농도에서 염색체의 구조적 이상빈도가 1.0, 0.5, 0.5%로 통계적으로 유의한 증가를 보이지 않았고 ($P > 0.05$), 양성대조물질 MMC를 처리한 군은 50.0%로서 현저한 염색체 이상이 관찰되었다 ($P < 0.001$). (Table 2) 실험조건에 따른 염색체 이상의 종류는 Table 4에 기록하였다.

Table 3. Metaphase analysis data-6 hr treatment

Compound	Dose (µg/ml)	S9 mix	Time (hr) ¹⁾	No. of structural aberration (%) ²⁾								
				ctb	cte	csb	cse	Aberration excluding gap (%)			Aberration including gap (%)	
NC	0	+		1	0	0	0	0.5	1	0	0	1.0
Decaffeine green tea extract	5000	+		2	0	0	0	1.0	2	0	0	2.0
	2000	+	6	1	0	0	0	0.5	1	0	0	1.0
	1000	+		1	0	0	0	0.5	2	0	0	1.5
CP	10	+		53	45	1	3	51.0	3	0	0	52.5
NC	0	-		0	0	0	0	0.0	1	0	0	0.5
Decaffeine green tea extract	5000	-		1	1	0	0	1.0	0	0	0	1.0
	2000	-	6	1	0	0	0	0.5	1	0	0	1.0
	1000	-		1	0	0	0	0.5	1	0	0	1.0
MMC	1	-		39	41	2	4	43.0	3	0	0	44.5

NC, EMEM media; CP, Cyclophosphamide; MMC, Mytomycin C.

¹⁾ Treatment time.

²⁾ ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, ctg: chromatid gap, csg: chromosome gap, endo: endoreduplication

Table 4. Metaphase analysis data-24 hr treatment

Compound	Dose (µg/ml)	S9 mix	Time (hr) ¹⁾	No. of structural aberration (%) ²⁾								
				ctb	cte	csb	cse	Aberration excluding gap (%)	ctg	csg	endo	Aberration including gap (%)
NC	0	-		1	0	0	0	0.5	1	0	0	1.0
	5000	-		2	0	0	0	1.0	1	0	0	1.5
Decaffeine green tea extract	2000	-	24	1	0	0	0	0.5	1	0	0	1.0
	1000	-		1	0	0	0	0.5	1	0	0	1.0
MMC	1	-		52	41	4	3	50.0	3	2	0	52.5

NC, EMEM media; MMC, Mytomycin C.

¹⁾ Treatment time.

²⁾ ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, ctg: chromatid gap, csg: chromosome gap, endo: endoreduplication

위의 결과에서 양성대조물질인 cyclophosphamide와 mitomycin C는 각각의 조건에서 현저한 염색체이상을 유발하여 S9 혼합물의 유효성분과 본 시험 시스템의 민감성이 입증되었고, 음성대조군인 용매처리 군에서도 염색체이상세포수가 시험적합성판정범위 내로 평가되어 본 시험의 타당성이 입증되었다. 따라서, 시험물질인 탈카페인녹차의 열수추출물은 본 시험 조건 하에서 CHL 세포에 대한 염색체이상을 일으키지 않는 물질로 평가된다.

위에서 언급했던 것과 같이 녹차시장은 점점 커지고 있으며 단순한 녹차제품이 아니라 카테킨 성분을 강화한 것과 같이 기능성을 강조한 제품들도 시장에 속속 나타나고 있다. 하지만 아직까지 국내 제품 중에서는 탈카페인 녹차가 없는 실정이다. 따라서 초임계유체를 이용한 탈카페인 녹차를 상용화 할 경우 녹차 시장에서 상당한 우위를 점유할 수 있을 것으로 예상된다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업 (No. 204016-3)의 지원에 의해 이루어진 것임

참고 문헌

Alessandra Gamberucci, Laura Konta, Angela Colucci, Roberta Giunti Judit E. Magyar, Jo zsef Mandl, Ga bor Ba nhegyi, Angelo Benedetti, Miklos Csala (2006) Green tea flavonols inhibit glucosidase II. *Biochem Pharmacol*, **72**, 640-646.
 Ashihara, H. and A. Crozier (2001) Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. *Trends Plant Sci.* **6**, 407-413.
 Galloway S.M., et al (1994) Report from working group on *in vitro* tests for chromosomal aberration, *Mutat. Res*, **312**, 241-61.
 Hiroshi Ashihara and Alan Crozier (2001) Caffeine: a well

known but little mentioned compound in plant science. *TRENDS in Plant Science* **6**(9), 407-413.
 Ishidate Jr. M. and Odashima S. (1997) Chromosome test with 134 compounds on chinese hamster cells *in vitro*-a screening for chemical carcinogens. *Mutat. Res*, **48**, 337-354.
 Kim BS, Zhao B, Kim HJ, Cho M. (2000) The statistical analysis of the *in vitro* chromosome aberration assay using Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res*, **469**, 243-52.
 Kondo K, Takase S, Nishimoto Y, Miyajima H, Shiratori O, Miyake Y. (2001) Genotoxicity studies of cefmatilen hydrochloride hydrate (S-1090). *J Toxicol Sci.* **26**(1), 243-54.
 Koyama H. et al (1970) A new cell line derived from new born chinese hamster lung tissue. *Gann*, **61**, 161-167.
 K. Ramalakshmi and B. Raghavan (1999) Caffeine in Coffee: Its Removal. Why and How? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **39**(5), 441-456.
 Margriet Westerterp-Plantenga, Kristel Diepvens, Annemiek M.C.P. Joosen, Sonia Bérubé-Parent, Angelo Tremblay (2006) Metabolic effects of spices, teas, and caffeine. *Physiology & Behavior*, **89**, 85-91.
 Nawrot, P., S. Jordan, J. Eastwood, J. Rotstein, A. Hugenholtz and M. Feeley (2003) Effects of caffeine on human health. *Food Additives and Contaminants*, **20**, 1-30.
 OECD (1997) OECD guideline for testing of chemicals, Section 4 : Chapter 473, *In vitro* mammalian chromosome aberration test. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
 Ping Li, Yanhui Wang, Runyu Ma, Xiaolin Zhang (2005) Separation of tea polyphenol from Green Tea Leaves by a combined CATUFM-adsorption resin process. *Journal of Food Engineering*, **67**, 253-260.
 Ribeiro DA, Marques ME, Salvadori DM. (2006) Genotoxicity and cytotoxicity of glass ionomer cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *J Mater Sci Mater Med*, **17**(6), 495-500.
 Sakanaka, S. (2003) A novel convenient process to obtain a raw decaffeinated tea polyphenol fraction using a lignocellulose column. *J. Agric. Food Chem*, **51**, 3140-3143.
 Sera N, Fukuhara K, Miyata N, Tokiwa H. (2001) Micronucleus induction and chromosomal aberration of 1- and 3-nitroaza-

benzo[a]pyrene and their N-oxides. *Mutagenesis*, **16**(3), 183-187.

국립환경연구원 (1998) 국립환경연구원고시 제 1998-41호 (1998년 12월 23일) '화학물질유해성시험연구기관의 지정 등에 관

한 규정'.

김중태 (2000) "(주)한국차문화협회" 제5-6호.

박문호 (2003) "우리나라 녹차산업의 경쟁력 제고방안". 농촌경제, 제26권 제1호.