

녹차 theanine을 이용한 젤리 제조 및 품질특성 조사

김성경¹ · 정하나² · 임애은² · 양광열³ · 최용수⁴ · 남승희^{1,2*}

¹전남대학교 식품공학과, ²전남대학교 농업과학기술연구소,
³전남대학교 응용생물학과, ⁴전남과학대학교 화훼원예학과

Production of green tea jelly using theanine and its physiochemical characterization

Seong Gyung Kim¹, Hana Jeong², Ae Eun Im², Kwang-Yeol Yang³, Yong Soo Choi⁴, and Seung-Hee Nam^{1,2*}

¹Department of Food Science & Technology, Chonnam National University

²Institute of Agricultural Science and Technology, Chonnam National University

³Department of Applied Biology, Chonnam National University

⁴Department of Floriculture, Chonnam Techno University

Abstract Theanine, the major amino acid and a sweet umami component of green tea, has anti-stress effects in humans. From green tea, theanine was extracted at 80°C for 2 h using a low temperature, high pressure extractor, and caffeine was removed using an HP-20 column with 80% ethanol. Theanine extracts were applied to produce functional jelly using three kinds of gelling agents (I, II, and III) or various concentrations of theanine extracts (10-50%). Theanine jelly was characterized with respect to its physical properties, product stability, and physiological function. Gelling agent III (tamarind gum, xanthan gum, and locust bean gum=2:3:5, w/w/w) and S3 (35% theanine extracts) jelly exhibited the optimum textural properties with lower hardness and high springiness. Among theanine jellies, S3 exhibited optimum product stability, high 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging, and acetylcholinesterase inhibitory activity. These results indicate that theanine extracts could be used as a neuroprotective source in the food industry.

Keywords: green tea, theanine jelly, physiochemical property, AChE inhibitory

서 론

녹차는 세계에서 물 다음으로 다량 소비되는 음료 중 하나로 *Camellia sinensis* 잎을 가공하여 제조된다(Senanayake, 2013; Kim 등, 2019). 녹차의 채엽 시기에 따라 녹차의 화학적인 성분 조성이 달라지고, theanine은 향기성분과 감칠맛 성분에 중요한 인자로 작용하며 소비자 기호에 큰 영향을 준다(Choi와 Rhyu, 1992; Kim 등, 2019; Senanayake, 2013). 녹차는 이미 수많은 연구로 기능성이 밝혀진 식품 소재이다. 녹차에 함유된 theanine은 LDL (Low density lipoprotein)의 산화 억제, 혈행 개선의 효능이 있고, 녹차 추출물 섭취 시 스트레스관련 신경전달물질 및 호르몬 조절 작용 효과가 있다고 알려져 있다(Lee 등, 2010). 더하여 신경안정, 이완, 코티졸 수치 감소 등 항스트레스 효능이 있으며, 치매 발병 예방에 도움을 준다(Owens 등, 2002; Yuk 등, 2007).

녹차에 함유된 GABA (gamma amino butyrate) 역시 신경전달물질로서 불안감 완화, 항우울 효능이 있다(Teng 등, 2017; Wee

등, 2015). GABA는 포유류 뇌에서 최초로 발견되어 수많은 연구로 대뇌 피질의 억제성 신경전달 물질임이 밝혀졌고, 이는 척추 동물과 무척추 동물 모두에서 억제 효과가 있다(Owens 등, 2002; Yuk 등, 2007). GABA는 theanine과 함께 알파파 증가와 베타파 감소를 유도하는 역할을 수행하여 신경 안정 효능을 가지며, 염증성 사이토카인 수준을 감소시킴으로써 신경 행동 활성화와 기억 기능을 향상시켜 신경 세포를 보호하는 효과가 있다(Abdou 등, 2006; Sumathi 등, 2016).

하지만 체내에서 theanine과 길항적으로 작용하는 caffeine은 불안과 수면장애를 일으키며 스트레스 유발물질인 코티졸 수치를 높인다(Smith, 2002; Rogers 등, 2008). 차에는 3-5%의 caffeine이 함유되어 있으며, 하루 1.0g 이상 섭취할 경우 대뇌 피질을 자극하여 중추 신경계의 흥분을 유도하고, 불안, 감정 변화, 위장관 자극, 불면증, 등의 부정적인 측면이 초래될 수 있다(Ye 등, 2007; Yun 등, 2015). 또한 caffeine이 함유된 식품을 만성적으로 섭취하면 유산, 심적 스트레스가 증가되어 최근 decaffeine 식품의 수요가 증가하는 추세이다(Ye 등, 2007).

최근 기호식품 산업이 증가함에 따라, 젤리는 다양한 기능성 소재를 식품에 쉽게 적용시킬 수 있다는 점에서 식품 산업에서 큰 인기를 끌고 있다(Min과 Eun, 2016). 젤리는 과즙에 당과 겔화제를 혼합해 응고시킨 반고체상 스낵으로, 저작이 수월하여 치아가 완전히 발달되지 않은 유아나 약한 치아를 가진 고령층이 섭취하기에 부담이 없다는 장점이 있다(Hwang과 Thi, 2015). 젤리 제조 시 겔화제 구조 안에 물을 가두거나 고정시켜 흐름에 저

*Corresponding author: Seung-Hee Nam, Department of Food Science & Technology & Institute of Agricultural Science and Technology, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea
Tel: +82-62-530-0207
Fax: +82-62-530-0279
E-mail: namsh1000@hanmail.net/namsh1000@jnu.ac.kr
Received June 3, 2021; revised August 4, 2021;
accepted August 9, 2021

항하는 단단한 3차원 네트워크를 형성하는데, 겔화제 종류에 따라 겔화제가 가교 결합하는 형상이 달라지기 때문에 젤리의 조직감에서 차이를 보인다(Saha과 Bhattacharya, 2010).

본 연구에서는 녹차에서 저온진공추출 조건에서 추출 시간과 농도에 따른 녹차 추출 최적화를 진행한 뒤, 녹차 추출물에 함유된 caffeine을 HP-20 column으로 제거하여 theanine 기능성을 강조한 theanine 함유 젤리를 제조하였다. 또한 3종류의 겔화제와 theanine 추출물 첨가량(10-50%)에 따른 theanine 함유 젤리의 품질특성 및 제형안정성, 항산화 효과, acetylcholinesterase (AChE) 저해능을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 녹차는 전라남도농업기술원 차산업연구소에서 2019년 4월 25일 채취된 봄 잎차를 사용하였다. TLC와 LC-MS 분석에 사용된 녹차 성분분석을 위한 표준품으로는 GABA (γ -aminobutyric acid), L-theanine, caffeine (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 젤리 제조에 사용된 겔화제인 카라기난, 곤약, 텍스트린, 한천, 잔탄검, 로저스트룡검, 타마린드검 모두 식품 등급에서 사용하였고 ES 식품원료(ES food ingredients, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 본 연구에서는 텍스트린이나 잔탄검과 같이 겔 형성에 도움을 주는 비겔화제 또한 겔화제와 더불어 상호작용하며 겔의 형성을 견고하게 하므로 편하게 겔화제라 칭하였다. Methanol, ethyl acetate, trifluoroacetic acid (TFA)은 HPLC용으로(Alfa Aesar, Seoul, Korea) 사용하였다. 항산화능 측정용 시약으로 ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))와 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 모든 분석 시약은 순도가 90% 이상인 시약을 사용하였다. Theanine 함유 젤리 제조 시 사용한 GABA는 10% 다시미농축액에 *Lactobacillus hilgardii* 균주를 접종 및 배양하여 생산된 GABA를 동결건조 후 0.7% 첨가하였다. 또한 녹차 theanine 추출물 이외에 올리고당과 텍스트린을 부형제로 첨가하였다.

Theanine 추출조건 최적화 및 caffeine 제거

녹차 추출물의 추출 조건은 기능성물질인 theanine과 GABA가 녹차 첨가량 대비 가장 높은 비율로 추출되도록 설정하였다. 녹차 첨가 비율 8%, 2시간, 80°C의 cold vacuum extraction (Cosmos 660, Kyungseo E&P Co., Incheon, Korea) 조건에서 추출 및 농축하였다. 녹차 농축액을 ethyl acetate와 1:1 (v/v)로 혼합 후 ethyl acetate층을 분리하여 45°C에서 감압 농축하였다. 농축된 용기에 50% ethanol로 물질을 회수하고 HP-20 resin (DIAION HP-20, Iontec Co., Seongnam, Korea)을 1:1로 하여 물질을 resin에 binding 시킨 뒤 80% ethanol을 이용해 caffeine을 분리하였다.

Theanine 추출물 LC-MS 정량분석

LC-MS 분석기는 6410A triple quadrupole mass spectroscopy (Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였다. Column으로는 Gemini-NX C18 (4.6×150 mm, 3 μ m, Phenomenex)을 사용하였으며, Positive electro-spray ionization (+ESI)로 이온화 시킨 시료를 multiple reaction monitoring (MRM) mode에 주입하여 분석하였다. 시료는 5 μ L 주입하였으며, column oven을 35°C로 유지시켰다. 0.1% formic acid와 5 mM ammonium acetate가 혼합된 water와 methanol을 사용하여 0% methanol부터 95% methanol까지의 순서

로 변화시킨 후 다시 0% methanol로 낮춰서 유속 0.5 mL/min으로 30분간 분석하였다. Capillary voltage는 4 kV, nebulizer 압력은 40 psi로 유지하고 N₂ gas 온도는 310°C, 유속은 1.0 mL/min로 분석하였다.

Theanine 함유 젤리 제조

Theanine 함유 젤리는 겔화제 I-III까지 3종을 사용하였으며, 겔화제 I: 카라기난, 곤약, 텍스트린, 한천, 잔탄검(2:2:2:1:1=w/w/w/w/w), 겔화제 II: 카라기난, 로저스트룡검(4:6=w/w), 겔화제 III: 타마린드검, 잔탄검, 로저스트룡검(2:3:5=w/w/w)으로, 젤리 제조에 1.5% 농도로 사용하였다(Table 2). 녹차 theanine 추출물은 4가지 농도로, 10%(S1), 20%(S2), 35%(S3), 50%(S4)를 theanine 함유 젤리에 첨가하였다. 젤리 제조 시 정제수를 90°C로 가열하여 사용하였으며, 온도가 90°C로 유지되도록 자력 교반기에 온도를 90°C로 미리 설정한 뒤 사용하였다. 자력 교반기에서 원료가 정제수에 교질상태로 분산되도록 교반 하였으며, 겔화제는 프락토올리고당에 교질 상태로 혼합해 놓은 뒤 가열된 정제수에 잘 용해될 수 있도록 하였고, GABA 분말은 정제수에 녹여 사용하였다. 향료는 열에 의한 휘발을 막기 위해 95°C에서 5분간 살균 후 첨가하였다. 젤리 제조 과정 중 수분의 손실량을 고려하여 보정수를 준비하였다. 모든 물질이 완전히 교질 상태로 분산된 후에 틀에 넣고 상온에서 20분간 방냉 한 뒤 4°C 냉장고에 12시간 굳혀 실험에 사용하였다.

Theanine 함유 젤리의 수분함량, 탁도, 색도

젤리의 수분 함량은 상압가열건조법을 따라 105°C에서 3회 반복 측정하였으며, 젤리의 탁도는 완성된 겔을 30°C에서 30분간 얼을 가한 후 졸(sol) 상태에서 microplate spectrophotometer (Epoch microplate spectrophotometer, Biotek Epoch., Winooski, VT, USA)를 이용하여 600 nm에서 측정하였다(Kim 등, 2020). 색도는 완전히 굳은 상태의 기포가 없는 시료의 중심부를 잘라 L 값(lightness), a 값(redness), b 값(yellowness)을 색차계(CR-400 m KONICA, MINOLTA, Tokyo, Japan)로 측정하였다.

Theanine 함유 젤리의 조직감 측정

Theanine 함유 젤리의 물성측정은 시료를 10×10×10 mm³ 크기로 절단하여 Texture meter (XforceP, Zwick Roell Co., Ulm, Germany)를 이용해 경도(hardness), 탄력성(springiness), 응집성(cohesiveness), 씹힘성(chewiness) 및 점착성(gumminess)을 2회 압착시험을 통해 측정하였다. 측정 조건은 지름이 15 mm인 probe를 부착하여 start position speed 5 mm/s, 1회 압착 시 compression ratio를 70%, 2회 압착 시 compression ratio를 20% 설정하였다.

Theanine 함유 젤리의 품질특성 및 제형안정성

산도 측정은 theanine 함유 젤리 1 g에 증류수 10 mL를 넣고 균질화 한 뒤 사용하였으며, 균질화 용액 10 mL에 1% 페놀프탈레인 용액을 2-3방울 넣고 교반한 뒤 0.1 N NaOH을 첨가하여 변색지점에 도달할 때까지 중화 적정하였다. 소요된 NaOH양을 citric acid로 환산하여 나타내었다. 젤리의 pH 및 가용성 고형분 측정을 위해 시료 3 g과 증류수 30 mL를 함께 Tissue Ruptor (TR 12520423, QIAGEN Co., Hombrechtikon, Switzerland)로 균질화된 용액을 pH meter (Ion S220, METTLER TOLEDO, Columbus, OH, USA)와 굴절 당도계(Pocket refractometer PAL-1, ATAGO Co., Tokyo, Japan)로 측정하였다. 이소울(syneresis)은 theanine 함유 젤리를 15×15×15 mm³로 절단하여 상대습도 60%, 온

도 4°C가 유지되는 desiccator에 넣고 5일 후 측정하여 다음의 식에 값을 대입하였다(Kim 등, 2020).

$$\text{Syneresis (\%)} = \frac{\text{Weight of separated liquid (g)}}{\text{Weight of gel (g)}} \times 100$$

젤리의 붕괴율은 제형 안정성에 관여하는 항목으로 이를 측정하기 위해 액체상태의 졸 50 g을 100 mL 비이커에 넣고 4°C 냉장고에서 2시간 냉각 후 측정하였다. water bath (Heating Bath BS-31, Jeio tech., Daejeon, Korea)에서 40°C, 10분간 반응 후 비이커에서 꺼낸 겔을 6 mesh 금속망에 올려놓아 30초간 분리하였다. 붕괴율은 분리된 졸의 중량을 겔 전체 중량에 대한 중량백분율(%)로 하였다(Choi 등, 2007).

DPPH 항산화 활성 측정

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)의 radical 소거능을 알아보기 위해 시료 3 g과 증류수 30 mL을 함께 Tissue Ruptor로 균질화 한 후 1000×g에서 10분간 원심분리(Combi 514R, Hanil Scientific Co., Incheon, Korea)하여 상등액을 취해 사용하였고, 농도별로 제조한 시료 50 µL와 1 mM DPPH reagent 250 µL를 암소에서 37°C, 15분간 반응시켜 517 nm 파장에서의 흡광도를 microplate spectrophotometer로 측정하였다. DPPH radical 소거능은 아래의 식을 이용하여 도출하였고, 표준 곡선은 ascorbic acid를 사용하였다. ABS는 실험구의 흡광도이다.

$$\text{Radical scavenging activity} = (1 - \text{ABS}_{\text{sample}} / \text{ABS}_{\text{control}}) \times 100$$

AChE 저해 활성 측정

Acetylcholinesterase 저해 효과는 Kim 등(2018)의 방법을 이용해 측정하였다. 먼저 acetylcholinesterase (0.25 unit/mL) 50 µL, 200 mM phosphate buffer (pH 7.5) 50 µL, 시료 50 µL를 혼합하여 15분간 96 well plate에서 반응시킨 뒤, acetylthiocholine 50 µL과 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)이 포함된 용액 50 µL을 추가하고 10분 뒤 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이와 같은 방법으로 시료 대신 phosphate buffer 50 µL를 넣고 이를 control로 이용하였다. ABS는 실험구의 흡광도이다.

$$\text{Inhibition (\%)} = (1 - (\text{ABS}_{\text{sample}} / \text{ABS}_{\text{control}})) \times 10$$

통계처리

모든 실험은 3회 반복 수행하여 Mean±SD로 나타내었고, 데이터는 일원분산분석(One-way ANOVA)을 이용하여 분석하였다. 유의적 차이는 던컨의 다중범위검정법(Duncan's multiple range test)을 이용해 유의수준 p<0.05 범위에서 검정하였다. 본 연구의 모든 통계는 SPSS (SPSS version 23.0 for windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) program을 이용하였다.

결과 및 고찰

Theanine 추출조건 최적화 및 caffeine 제거

녹차 농도, 추출 시간에 따른 theanine, GABA, caffeine 함유량을 비교한 표는 Table 1에 나타났다. 녹차 농도가 증가할수록 theanine, GABA 함량이 증가하는 경향을 나타냈지만 caffeine의 경우 녹차 농도와 추출 시간에 따른 추출 성분의 양은 증감의 경향성이 없었다. 이는 Jo 등(2016)이 보고한 연구와 유사한 결과를 나타냈고, caffeine 추출의 경우 시간보다 용매에 따라 추출량이 변화하는 것으로 판단된다(Jo 등, 2016). 또한 추출 시간이 길어짐에 따라 theanine, GABA 추출량이 증가하였으나 3% 녹차 추출액에서는 추출 시간이 증가하더라도 theanine, GABA 함량에 일관적인 증감의 경향성이 없었다. 추출 수율은 8% 녹차 함유 2 시간 추출 조건에서 높은 theanine (0.95 mg/mL), GABA (0.28 mg/mL)와 비교적 낮은 caffeine (1.45 mg/mL)이 추출되어 이 조건을 이용해 theanine을 추출했다.

녹차 추출액을 HP-20 column에 충분히 노출시켜 caffeine이 HP-20 column 표면에 결합하도록 한 뒤 HP-20 column resin과 caffeine이 제거된 여액을 분리하였다. TLC와 LC-MS에서 caffeine이 분리되었음을 확인할 수 있다(Fig. 1). LC-MS상에서 caffeine의 peak area가 크게 줄어들음을 확인할 수 있으며, 이로써 HP-20 column을 이용해 녹차 추출물에 함유된 caffeine이 제거됨을 확인할 수 있다. 다공성 합성 흡착 resin을 이용한 column chromatography 법 이외에 화학적 처리 방법으로 methylene chloride, chloroform, ethyl acetate를 사용하여 caffeine을 제거할 수 있지만, methylene chloride는 두통과 어지러움을 유발할 수 있으며, chloroform과 ethyl acetate 또한 caffeine 제거에 효율적이나 caffeine 제거에 사용된 물질이 식품 중 잔류하여 식품에 사용하기 어려운 단점이

Table 1. Extraction rates of theanine, GABA, and caffeine for green tea at various sample to solvent ratios and extraction times

Extraction periods	Green tea (w/v)	Theanine (mg/mL)	GABA (mg/mL)	Caffeine (mg/mL)
1 h	3%	0.67±0.05 ^{1)f 2)}	0.11±0.00 ^{gh}	0.84±0.09 ^f
	5%	0.71±0.02 ^{ef}	0.15±0.03 ^{fg}	0.84±0.03 ^f
	8%	0.76±0.03 ^{def}	0.15±0.03 ^{fg}	1.25±0.06 ^e
	10%	0.84±0.05 ^{cde}	0.23±0.02 ^{de}	1.66±0.05 ^c
2 h	3%	0.67±0.05 ^f	0.07±0.00 ^b	1.86±0.08 ^b
	5%	0.88±0.12 ^{cd}	0.19±0.01 ^{ef}	2.07±0.12 ^a
	8%	0.95±0.11 ^{bc}	0.28±0.04 ^c	1.45±0.08 ^d
	10%	1.05±0.15 ^{ab}	0.35±0.03 ^b	1.45±0.13 ^d
3 h	3%	0.67±0.08 ^f	0.11±0.02 ^{gh}	0.84±0.00 ^f
	5%	0.92±0.09 ^{bc}	0.27±0.04 ^{cd}	1.66±0.00 ^c
	8%	0.97±0.02 ^{abc}	0.31±0.02 ^{bc}	1.45±0.05 ^d
	10%	1.09±0.01 ^a	0.43±0.03 ^a	1.45±0.07 ^d

¹⁾All values are three replications with Mean±SD.

^{2)a-d}Duncan's multi-range test at p<0.05.

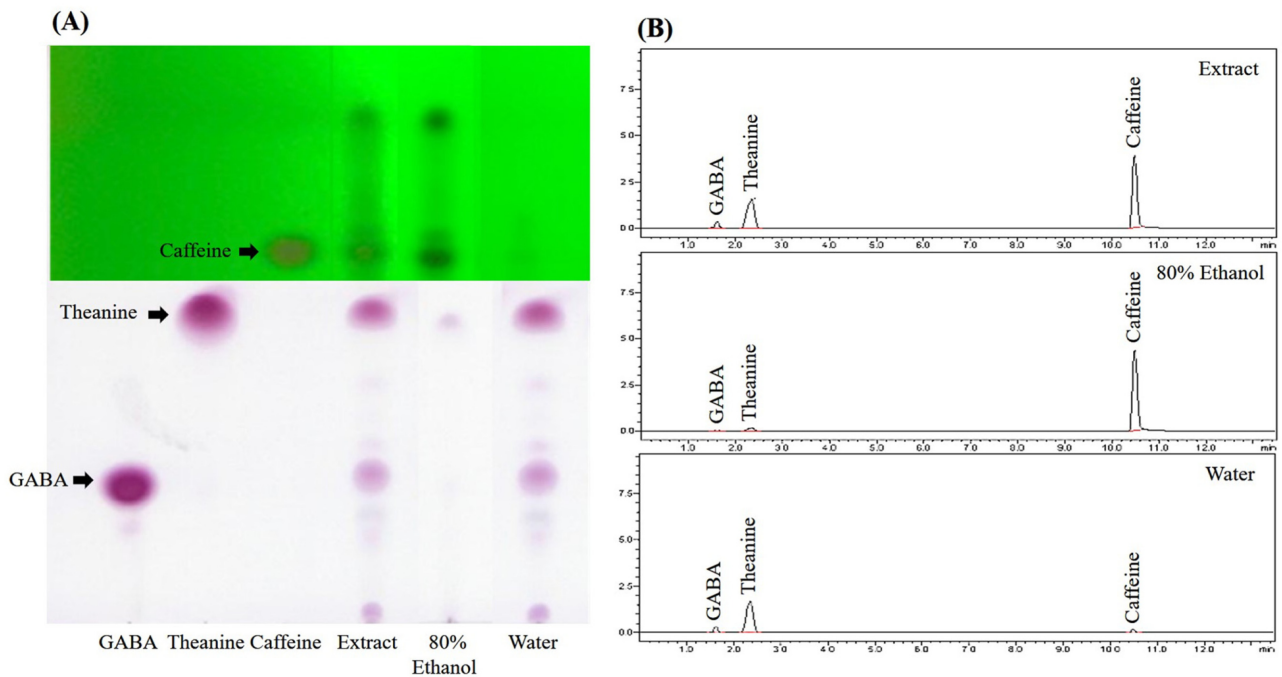


Fig. 1. Theanine separation from green tea extract after removing caffeine using HP-20 column. TLC analysis (A), LC-MS analysis (B).

Table 2. Formulation of theanine jelly with various gelling agents or theanine extract content

Ingredients	Gelling agents (I, II, III)	Theanine extracts ²⁾			
		S1 (10%)	S2 (20%)	S3 (35%)	S4 (50%)
Theanine extract ¹⁾	35.00	10.00	20.00	35.00	50.00
GABA powder	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70
Gelling agent	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Maltodextrin, Oligosaccharides	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0
Apple flavor	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52
Water	39.28	64.28	54.28	39.28	24.28
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.0

¹⁾I: carrageenan gum, konjac, dextrin, agar and xanthan gum mixtures (2:2:2:1:1=w/w/w/w/w)

II: carrageenan gum and locust bean gum mixtures (4:6=w/w)

III: tamarind gum, xanthan gum, and locust bean gum mixtures (2:3:5=w/w/w).

²⁾Theanine extract (10% theanine content) was prepared from green tea 8% for 2 h using cold vacuum extraction, and gelling agent III (1.5%) was applied to produce jelly.

있다(Mumin 등, 2006). 이외에도 초임계 이산화탄소를 이용하여 caffeine을 안전하게 제거할 수는 있으나, 이는 경제성과 caffeine 제거 효율이 떨어져 산업에 적용하기 어렵기 때문에 본 연구에 사용한 caffeine 제거 방법이 식품 산업에 적용될 수 있을 것으로 판단된다. 본 연구와 비슷한 방법으로 caffeine 분리에 성공한 Mumin 등(2006)의 연구에 따르면 column-chromatographic extract (CCE) 방법을 이용하여 녹차 시료에 물과 30% ethanol을 각각 4 배 희석한 뒤 70°C에서 1시간 초음파 추출한 다음 다공성 수지 HP-20 column에 흡착시켜 물과 95% ethanol로 caffeine을 분리했다.

Theanine 함유 젤리 제조 및 색도와 탁도

제조된 theanine 함유 젤리의 색도와 탁도는 Table 3에 제시되었으며, 겔화제 I을 이용한 theanine 함유 젤리는 가장 밝고 탁도

가 높으며 겔화제 III을 이용한 theanine 함유 젤리는 밝기는 낮으나 녹색도는 높고 탁도가 낮아 품질이 가장 우수하였다. Theanine 농도별로 첨가한 젤리의 색도와 탁도는 theanine 추출물의 농도가 증가할수록 L값, b값, 탁도는 증가하는 경향을 보였지만, 35%(S3)와 50%(S4)는 유의적 차이가 없었다(Table 3). a값은 theanine 추출물의 농도가 높을수록 감소하는 경향을 보였다(Table 3). Theanine 추출물의 함량이 증가할수록 녹차에서 용출된 물질의 함량이 높아 a값이 감소한 것으로 해석된다. 또한 theanine 추출물의 함량이 높을수록 b값이 증가하는 결과는 식물 내에 색소 성분으로 다량 존재하는 클로로필계 색소가 가공 및 저장 중에 온도, pH, 시간, 효소, 산소 및 빛에 의해 산화되었기 때문이다(King 등, 2001; Kwak 등, 2009). 녹차 함량이 많을수록 b값이 증가하는 것은 Park 등(1999)이 보고와도 일치한다.

Theanine 함량이 증가함에 따라서 탁도 또한 증가하는 경향을

Table 3. Hunter's color value and turbidity of theanine jelly

Compositions	Hunter's color value				Turbidity (600 nm)	
	L*	a*	b*	ΔE*		
Gelling agent ¹⁾	I	12.66±0.09 ³⁾⁴⁾	-0.25±0.03 ^b	5.07±0.10 ^a	83.64±0.09 ^d	0.60±0.01 ^a
	II	9.53±0.01 ^b	0.00±0.04 ^a	3.55±0.07 ^b	86.72±0.01 ^c	0.41±0.00 ^b
	III	6.40±0.19 ^c	-0.61±0.04 ^d	0.07±0.26 ^c	89.83±0.19 ^b	0.22±0.00 ^c
Theanine extract ²⁾	S1 (10%)	5.16±0.71 ^d	-0.44±0.11 ^c	-1.28±0.73 ^d	91.10±0.73 ^a	0.11±0.01 ^e
	S2 (20%)	5.65±0.24 ^d	-0.59±0.08 ^d	-0.84±0.54 ^d	90.59±0.26 ^a	0.15±0.00 ^d
	S3 (35%)	6.40±0.19 ^c	-0.61±0.04 ^d	0.07±0.26 ^c	89.83±0.19 ^b	0.22±0.00 ^c
	S4 (50%)	6.62±0.38 ^c	-0.61±0.02 ^d	0.12±0.12 ^c	89.61±0.38 ^b	0.22±0.01 ^c

¹⁾I: carrageenan gum, konjac, dextrin, agar and xanthan gum mixtures (2:2:2:1:1=w/w/w/w/w)

II: carrageenan gum and locust bean gum mixtures (4:6=w/w)

III: tamarind gum, xanthan gum and locust bean gum mixtures (2:3:5=w/w/w).

²⁾Theanine extract (10% theanine content) was prepared from green tea 8% for 2 h using cold vacuum extraction, and gelling agent III (1.5%) was applied to produce jelly.

³⁾All values are three replications with Mean±SD.

^{4)a-c}Duncan's multi-range test at $p<0.05$.

Table 4. Textural properties of theanine jelly

Compositions	Hardness (g)	Springiness	Cohesiveness	Gumminess (g)	Chewiness (g)	
Gelling agent ¹⁾	I	2360±0 ^b	0.63±0.00 ^c	0.09±0.00	203.1±0.0 ^{ab}	127.2±0.0 ^{ab}
	II	2620±10 ^a	0.77±0.01 ^b	0.09±0.01	225.6±23.0 ^a	172.5±19.3 ^a
	III	1740±10 ^c	0.85±0.02 ^{ab}	0.09±0.02	159.4±35.5 ^{bc}	135.9±32.6 ^{ab}
Theanine extract ²⁾	S1 (10%)	1350±20 ^e	0.87±0.03 ^a	0.08±0.00	107.8±1.0 ^c	93.1±1.8 ^b
	S2 (20%)	1613±58 ^d	0.80±0.12 ^{ab}	0.11±0.02	172.2±31.6 ^{ab}	135.3±15.0 ^{ab}
	S3 (35%)	1740±10 ^c	0.85±0.02 ^{ab}	0.09±0.02	159.4±35.5 ^{bc}	135.9±32.6 ^{ab}
	S4 (50%)	1777±50 ^c	0.88±0.04 ^a	0.10±0.03	172.2±59.7 ^{ab}	152.9±58.9 ^a

¹⁾I: carrageenan gum, konjac, dextrin, agar and xanthan gum mixtures (2:2:2:1:1=w/w/w/w/w)

II: carrageenan gum and locust bean gum mixtures (4:6=w/w)

III: tamarind gum, xanthan gum and locust bean gum mixtures (2:3:5=w/w/w).

²⁾Theanine extract (10% theanine content) was prepared from green tea 8% for 2 h using cold vacuum extraction, and gelling agent III (1.5%) was applied to produce jelly.

³⁾Not significant at $p<0.05$. All values are three replications with Mean±SD.

^{4)a-c}Duncan's multi-range test at $p<0.05$.

보이는데 이는 HP-20 column을 이용하여 theanine과 GABA를 제외한 기타 녹차 성분을 제거하였다고 하더라도 남아있을 물질들과 녹차에 함유된 polyphenol성분이 작은 입도의 크기로 용매의 분산상에 존재하기 때문이다(Bindes 등, 2019). 녹차의 탁도를 낮추어 안정성을 오랜 기간 유지하기 위하여 미세 여과를 통해 불순물을 여과하는 과정을 추가 시, 탁도가 낮은 젤리를 생산할 수 있다(Bindes 등, 2019).

한천은 전리성 겔화제로 끓는 물에 용해되어 냉각 시 3차원 네트워크가 형성되며, 탁도가 높아지는 특징이 있다(Saha 등, 2010). 따라서 한천과 텍스트린이 첨가된 겔화제 I로 제조한 젤리가 한천이 첨가되지 않은 겔화제 II와 겔화제 III으로 제조한 젤리 보다 탁도가 크다(Saha 등, 2010).

Theanine 함유 젤리의 조직특성 분석

Theanine 함유 젤리의 조직 특성은 Table 4에 나타냈다. 조직감 판단 요소 중 응집성(cohesiveness)은 시료간 차이가 없었다. 경도(hardness)와 탄력성(springiness)은 시료 30%(S3)과 50%(S4)가 유사한 수치를 보였으며, 젤리의 조직감은 겔화제 III가 가장 우수하였다(Table 4). 젤리는 경도(hardness), 점착성(gumminess),

씹힘성(chewiness)이 낮고 탄력성(springiness)이 높아야 우수한 조직특성을 나타내는데 겔화제 III는 경도와 점착성이 낮고 탄력성이 높아 젤리로의 조직감이 우수하였다. 반면 겔화제 I과 겔화제 II는 경도와 점착성이 높고 탄력성이 낮아 작은 충격에도 젤리가 쉽게 붕괴되었다. 겔화제 III의 구성 성분에는 비겔화제인 잔탄검과 겔화제인 로거스트콩검이 3:5 (w/w) 비율로 다른 물질화 함께 혼합되었는데 이는 겔을 형성하지 않는 비겔화제가 겔화제와 함께 상호작용하여 탄성을 높이기 때문이다(Saha 등, 2010). 잔탄검과 로거스트콩검은 5:5 비율로 혼합되었을 때 최대로 상호작용한다고 보고되었지만, 본 실험에서의 theanine 함유 젤리는 타마린드검, 잔탄검, 로거스트콩검(2:3:5=w/w/w)인 겔화제 III의 구성일 때 theanine 함유 젤리로서 가장 우수한 탄성을 보였다(Saha 등, 2010).

일반적으로 카라기난과 한천은 경도가 높고 탄력성과 응집성은 낮은 특성을 가지는데 카라기난의 함량이 가장 높은 겔화제 II가 가장 높은 경도값을 나타내었고, 겔화제 I, 겔화제 III 순서로 경도가 감소하였다(Kim 등, 2020). 점착성을 측정할 때는 주로 젤리와 같은 반고체 식품을 측정할 때 사용되고 씹힘성은 고체시료에 사용하기 때문에 본 연구에서는 씹힘성보다는 점착성

Table 5. Product stability and physicochemical properties of theanine jelly

Compositions		Acidity (%)	pH	Soluble solids (°Brix)	Moisture (%)	Syneresis (%)	Melting down rate (%)
Gelling agent ¹⁾	I	0.63±0.01 ^{3)a4)}	4.31±0.00 ^b	19.9±1.0 ^b	81.81±0.07 ^a	6.84±0.80 ^a	36.37±2.29 ^a
	II	0.46±0.02 ^c	4.29±0.00 ^c	21.3±0.2 ^a	81.81±0.00 ^a	5.70±0.30 ^b	36.22±5.82 ^a
	III	0.55±0.03 ^{ab}	4.31±0.00 ^b	21.4±0.6 ^a	81.60±0.03 ^b	1.31±0.24 ^c	25.88±1.61 ^b
Theanine extract ²⁾	S1 (10%)	0.50±0.00 ^{bc}	4.26±0.01 ^d	21.2±0.3 ^a	81.77±0.11 ^a	1.69±0.47 ^c	35.80±0.00 ^a
	S2 (20%)	0.52±0.10 ^{bc}	4.29±0.00 ^c	21.4±0.0 ^a	81.75±0.02 ^a	1.36±0.65 ^c	30.36±0.17 ^b
	S3 (35%)	0.55±0.03 ^{ab}	4.31±0.00 ^b	21.4±0.6 ^a	81.60±0.03 ^b	1.31±0.24 ^c	25.88±1.61 ^b
	S4 (50%)	0.58±0.01 ^{ab}	4.35±0.01 ^a	21.5±0.1 ^a	81.47±0.04 ^c	1.79±0.16 ^c	25.93±0.91 ^b

¹⁾I: carrageenan gum, konjac, dextrin, agar and xanthan gum mixtures (2:2:2:1:1=w/w/w/w/w)

II: carrageenan gum and locust bean gum mixtures (4:6=w/w)

III: tamarind gum, xanthan gum, and locust bean gum mixtures (2:3:5=w/w/w)

²⁾Theanine extract (10% theanine content) was prepared from green tea 8% for 2 h using cold vacuum extraction, and gelling agent III (1.5%) was applied to produce jelly.

³⁾All values are three replications with Mean±SD.

^{4)a-e}Duncan's multi-range test at $p<0.05$.

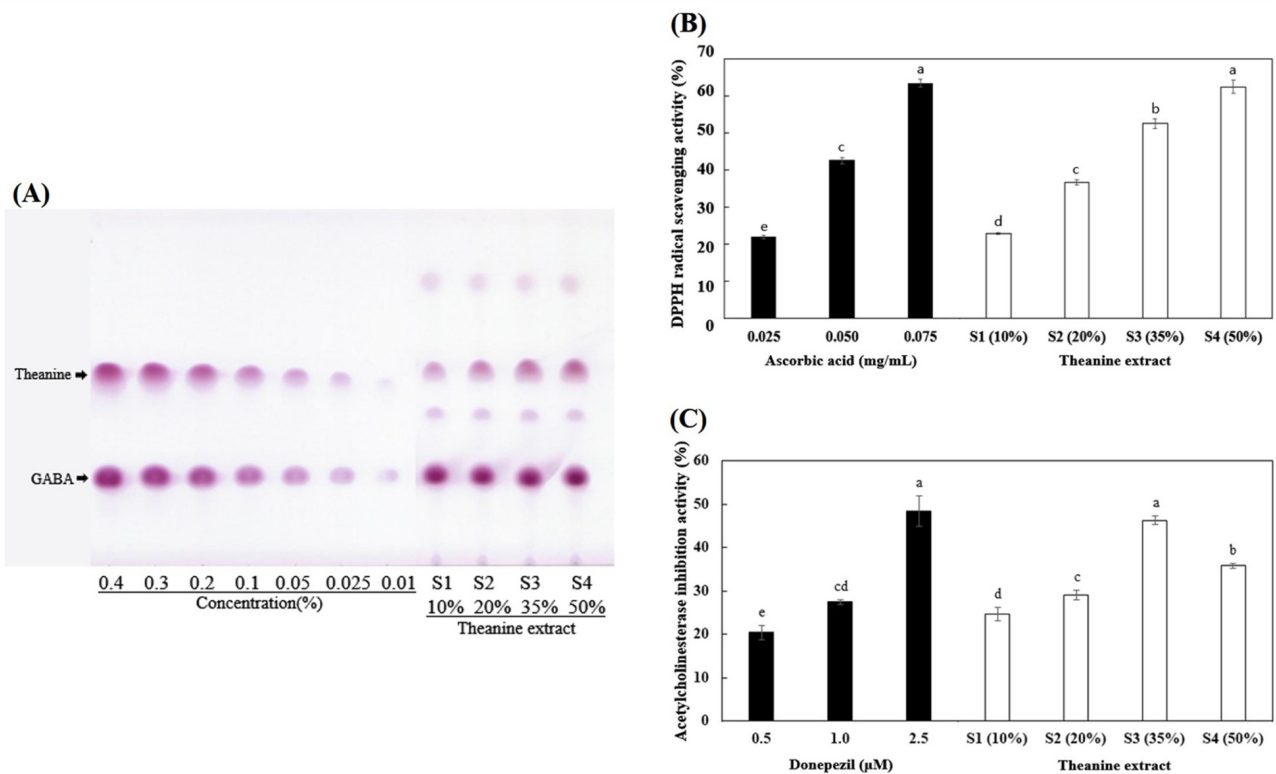


Fig. 2. Functional properties of theanine jelly with various theanine extract content. TLC analysis of theanine jelly (A), DPPH radical scavenging activity (B), and acetylcholinesterase (AChE) inhibition activity of theanine jelly (C). All values are three replications with Mean±SD. Duncan's multi-range test at $p<0.05$.

을 고려하였다. 겔화제 III, 겔화제 I, 겔화제 II 순서로 경도와 점착성이 증가되었다. 겔화제 III을 이용하였을 경우, 낮은 경도와 높은 탄력을 보유하였다.

Theanine 함유 젤리의 품질특성 및 안정성

Theanine 함유 젤리의 품질특성 및 안정성을 조사하였으며, 관련 품질 지표로 총산도, pH, 당도, 수분함량, 이수율, 붕괴율을 Table 5에 나타냈다. Theanine 추출물의 함량이 높아질수록 theanine 함유 젤리의 총 산도가 증가하고, pH가 높아지는 경향

을 보였다. 겔화제 I과 겔화제 II를 이용하여 생산한 젤리는 붕괴율에서 차이를 보이지 않았고, 카라기난이 함유되지 않은 겔화제 III의 붕괴율은 25.88%로 가장 낮았다. 또한 theanine 추출물에 따른 이수율은 S3이 1.31%로 높은 제형안정성을 나타냈다(Saha 등, 2010). 전체적으로 theanine 추출물의 농도가 증가할수록 수분함량이 줄어드는 경향이 있지만 유의적인 차이는 없었으며, 겔화제 I을 이용하여 제조한 젤리 이외에 전체적으로 theanine 함유 젤리의 당도 또한 차이가 없었다. 제형 안정성을 측정한 결과, theanine을 35% 첨가한 S3가 제형안정성이 가장 우수하였다. 또한 겔화

제 III을 이용한 녹차 theanine 함유 젤리의 기호도 조사 시, theanine 추출물 농도가 증가될수록 녹차의 풍미와 향이 높았으며 50% 추출물이 첨가된 S4는 쓴맛과 짝은맛이 강해 기호도가 낮았다. Theanine 추출물 10% 또는 20% 첨가된 젤리보다는 35%가 첨가된 젤리가 낮은 쓴맛으로 녹차의 향미 부분에서 기호도가 가장 높았다.

Theanine 함유 젤리의 항산화활성

Theanine 함유 젤리에 함유된 theanine과 GABA 함량 비교를 위한 TLC 결과는 Fig. 2A에 나타냈고, theanine 추출물 첨가량에 따른 DPPH radical 소거능은 Fig. 2B, AChE 저해 활성 측정 결과는 Fig. 2C에 나타냈다. 젤리 제조 시 적용되는 95°C에서 30분간 가열 살균 조건에도 theanine과 GABA 성분이 파괴되지 않고 대부분 잔존하는 것을 TLC를 통해 확인했다. Theanine 추출물의 농도가 높아질수록 DPPH radical 소거능은 뚜렷하게 증가하는 경향을 나타냈다. 녹차에 함유된 다양한 reductone의 함량에 따라 DPPH 환원력이 결정되는데, DPPH 환원 능력이 가장 뛰어난 50%(S4)는 0.075 mg/mL ascorbic acid 수준과 유사한 항산화 효과를 보였다(Fadda 등, 2014). 식물체 추출물의 DPPH radical 소거능을 측정하는 Fadda 등(2014)의 연구에 따르면 ascorbic acid는 3분 이내에 DPPH와 반응하고, EGCG는 2시간 반응 이후에도 항산화 활성이 증가한다고 보고되었다. 따라서 물질마다 DPPH 반응 적정 시간이 모두 다르므로 녹차에 함유된 reductone의 조성과 함량을 측정하는 추가적인 연구가 필요 할 것으로 판단된다(Villaño 등, 2007). Standard로 사용하는 ascorbic acid와 녹차에서 추출한 theanine 추출물과의 DPPH의 반응 완결 속도는 차이가 나므로 theanine 함유 젤리에 잠재된 항산화 활성이 있다고 판단된다(Atoui 등, 2005; Fadda 등, 2014).

Theanine 함유 젤리의 AChE 저해능

Theanine 함유 젤리의 acetylcholinesterase (AChE) 저해 효과를 조사하기 위해 AChE 저해제인 donepezil을 positive control로 사용하였다(De Andrade 등, 2019). Acetylcholine은 뉴런의 콜린성 신경전달 물질로 기억력 상실과 관련이 있는 물질이며 AChE 저해 활성 물질은 알츠하이머병 치료에 효과적이라고 알려져 있다(Singh 등, 2013). S1부터 S3까지 theanine 추출물의 농도가 높아질수록 AChE 저해 활성은 증가하는 경향이 나타났고, S3은 donepezil 2.5 µM과 동일한 수준의 AChE 저해 활성을 나타내었다. 하지만 흥미롭게도 theanine 추출물의 농도가 가장 높은 S4의 경우 AChE 저해 활성이 다시 감소하는 경향을 보였다. S4의 theanine 함유 젤리는 theanine 추출물이 S3보다 높게 함유되어 있음에도 불구하고 AChE 저해 활성이 낮았다. 이는 녹차 첨가량이 증가할수록 녹차에 함유된 다른 물질 함량도 증가되어 AChE 저해 작용에 영향을 줄 수 있다고 보고되었다(Unno 등, 2016).

요 약

본 연구에서는 저온진공조건에서 추출 시간과 농도에 따른 녹차 열수추출조건을 최적화한 후 HP-20 column으로 caffeine을 제거한 녹차 추출물을 이용해 theanine 함유 기능성 젤리를 제조하였다. 또한, theanine 함유 젤리의 품질 특성, 제형안정성 및 항산화 효과, AChE 억제능을 조사하였다. 최적추출조건은 8% 녹차 분말을 2시간 추출하여 theanine 0.95 mg/mL, GABA 0.28 mg/mL, caffeine 1.45 mg/mL 추출액을 HP-20 column을 이용해 80% 에탄올로 카페인을 제거하였다. 3종의 겔화제와 농도별로 4종의

theanine 추출물 S1-S4(10-50%)을 제조해 품질 특성을 조사한 결과, 젤리에 theanine 추출물이 많을수록 L값과 b값이 증가하였다. 젤리의 물리적 특성을 조사한 결과, 3가지 겔화제 중 타마린드 겔, 잔탄검, 로거스트콩겔(2:3:5=w/w/w)을 조합한 겔화제 III이 경도와 점착성이 낮고 탄력성이 높아 조직감이 가장 뛰어났다. 제형안정성 조사 시, 35%가 첨가된 S3가 이수를 25.88%과 붕괴율 1.31%로 우수한 제형안정성을 나타냈다. 또한 theanine 함유 젤리는 95°C, 30분간 가열조건에도 theanine과 GABA 성분이 파괴되지 않고 대부분 잔존하는 것을 TLC와 LC-MS 분석을 통해 확인했다. Theanine 추출물의 농도가 높을수록 DPPH radical 소거능은 증가하며, S4(50%)는 0.075 mg/mL ascorbic acid 수준과 유사한 항산화력을 나타냈다. AChE 저해 효과는 S3(35%)가 가장 높았으며 이는 donepezil 2.5 µM과 동일한 수준의 AChE 저해 활성을 나타냈다. 따라서 본 연구는 녹차 추출물에서 caffeine을 제거한 theanine 추출물로 기능성 젤리를 제조하였으며 품질 특성을 조사하였다.

감사의 글

본 연구는 전남대학교 산학협력단이 지원하는 역량고도화사업(2020-2021)과 농촌진흥청 연구 사업인 국내육성품종 녹차 이용 기능성물질 추출 및 제품개발(PJ012565)에서 지원받아 수행된 연구 결과이며 이에 감사드립니다.

References

- Abdou AM, Higashiguchi S, Horie K, Kim M, Hatta H, Yokogoshi H. Relaxation and immunity enhancement effects of γ -aminobutyric acid (GABA) administration in humans. *Biof.* 26: 201-208 (2006)
- Atoui AK., Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.* 89: 27-36 (2005)
- Bindes MMM, Cardoso VL, Reis MHM, Boffito DC. Maximisation of the polyphenols extraction yield from green tea leaves and sequential clarification. *J. Food Eng.* 241: 97-104 (2019)
- Choi EJ, Lee JE, Oh MS. The quality characteristics of grape jelly made with various gelling agents for consumption by elderly women. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* 23: 891-898 (2007)
- Choi SH, Rhyu MR. Analysis of theanine contents in commercial green tea. *Korean J. Food Sci. Technol.* 24: 177-179 (1992)
- de Andrade P, Mantoani SP, Nunes PSG, Magadán CR, Pérez C, Xavier DJ, Carvalho I. Highly potent and selective aryl-1, 2, 3-triazolyl benzylpiperidine inhibitors toward butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem.* 27: 931-943 (2019)
- Fadda A, Serra M, Molinu MG, Azara E, Barberis A, Sanna D. Reaction time and DPPH concentration influence antioxidant activity and kinetic parameters of bioactive molecules and plant extracts in the reaction with the DPPH radical. *J. Food Compos Anal.* 35: 112-119 (2014)
- Hwang ES, Thi ND. Quality characteristics of jelly containing aronia (*aronia melanocarpa*) juice. *Korean J. Food Sci. Technol.* 47: 738-743 (2015)
- Jo IH, Kim MK, Jang SY, Kim NR, Lee WY. Optimization of the re-extraction process of ethanol from catechin components from Korean green tea extract. *Korean J. Food Preserv.* 23: 696-703 (2016)
- Kim YM, Kim JM, Youn KS. Quality and textural properties of jelly prepared with different gelling agents. *Korean J. Food Preserv.* 27: 566-573 (2020)
- Kim JM, Park SK, Kang JY, Park SH, Park SB, Yoo SK, Han HJ, Lee SG, Lee U, Heo HJ. Nutritional composition, antioxidant capacity, and brain neuronal cell protective effect of cultivars of dried persimmon (*Diospyros kaki*). *Korean J. Food Sci. Technol.*

- 50: 225-237 (2018)
- Kim MS, Rha CS, Kim DO. Effects of commonly used infusion method on catechin content and antioxidant capacities of pure green tea packaged in tea bags. *Korean J. Food Sci. Technol.* 51: 356-360 (2019)
- King VAE, Liu CF, Liu YJ. Chlorophyll stability in spinach dehydrated by freeze-drying and controlled low-temperature vacuum dehydration. *Food Res. Int.* 34: 167-175 (2001)
- Kwak YJ, Kim JS. Changes of chlorophyll and SOD-like activities of Chinese chives dehydrated at different heat treatments. *Journal of the J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 879-884 (2009)
- Lee WK, Kim TI, Park SK, Park HK, Hong JT. Anxiolytic effect of a combination of green tea extract and L-theanine. *Lab. Anim.* 26: 63-68 (2010)
- Mumin A, Akhter KF, Abedin Z, Hossain Z. Determination and characterization of caffeine in tea, coffee and soft drinks by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography (SPE-HPLC). *Malays. J. Chem.* 8: 45-51 (2006)
- Owens DF, Kriegstein AR. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat. Rev. Neurosci.* 3: 715-727 (2002)
- Rogers PJ, Smith JE, Heatherley SV, Pleydell Pearce CW. Time for tea: mood, blood pressure and cognitive performance effects of caffeine and theanine administered alone and together. *Psychopharmacology* 195: 569-577 (2008)
- Saha D, Bhattacharya S. Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: A critical review. *J. Food Sci. Technol.* 47: 587-597 (2010)
- Senanayake SN. Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications-A review. *J. Funct. Foods.* 5: 1529-1541 (2013)
- Singh M, Kaur M, Kukreja H, Chugh R, Silakari O, Singh D. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: from nerve toxins to neuroprotection. *Eur. J. Med. Chem.* 70: 165-188 (2013)
- Smith A. Effects of caffeine on human behavior. *Food Chem. Toxicol.* 40: 1243-1255 (2002)
- Sumathi T, Asha D, Nagarajan G, Sreenivas A, Nivedha R. L-Theanine alleviates the neuropathological changes induced by PCB (Aroclor 1254) via inhibiting upregulation of inflammatory cytokines and oxidative stress in rat brain. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 42: 99-117 (2016)
- Teng J, Zhou W, Zeng Z, Zhao W, Huang Y, Zhang X. Quality components and antidepressant-like effects of GABA green tea. *Food Funct.* 8: 3311-3318 (2017)
- Unno K, Hara A, Nakagawa A, Iguchi K, Ohshio M, Morita A, Nakamura Y. Anti-stress effects of drinking green tea with lowered caffeine and enriched theanine, epigallocatechin and arginine on psychosocial stress induced adrenal hypertrophy in mice. *Phytomedicine.* 23: 1365-1374 (2016)
- Wee JH, Sung HM, Jung KO, Kim SJ, Shin YR, Park JH, Kim JD. Anti-adipogenic effects of the water extracts of defatted green tea seed cake. *Korean J. Food Sci. Technol.* 47: 525-533 (2015)
- Villaño D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso AM, García-Parrilla MC. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta.* 71: 230-235 (2007)
- Ye JH, Liang YR, Jin J, Liang HL, Du YY, Lu JL, Lin C. Preparation of partially decaffeinated instant green tea. *J. Agric. Food Chem.* 55: 3498-3502 (2007)
- Yuk DY, Kim TI, Park SG, Park HK, Yoon YK, Hong JT. Improvement of memory impairment by L-theanine through inhibition of acetylcholinesterase activity in mice. *Yakhak Hoeji.* 51: 409-414 (2007)
- Yun SS, Kim H, Jang SJ, Lim HS, Kim SH, Kim MH. Simultaneous determination of caffeine, theobromine and theophylline in tea leaves by HPLC. *Korean J. Food Sci. Technol.* 47: 556-560 (2015)