

## 국내외 홍차 추출물의 항산화 효과 및 Nitric Oxide 생성 저해 효과

문교하<sup>1,5</sup> · 김경지<sup>2,5</sup> · 이유림<sup>1,5</sup> · 김종철<sup>3</sup> · 심두보<sup>3</sup> · 정강현<sup>1</sup> · 이권재<sup>4</sup> · 안정희<sup>5,\*</sup>

<sup>1</sup>서울과학기술대학교 식품공학과, <sup>2</sup>서강대학교 융합의생명공학과, <sup>3</sup>(재)하동녹차연구소,  
<sup>4</sup>대전대학교 신소재공학, <sup>5</sup>KC 대학교 식품영양학과

### Antioxidant and nitric oxide inhibition effect of domestic and foreign fermented black tea extracts

Gyo-Ha Moon<sup>1,5</sup>, Gyeong-Ji Kim<sup>2,5</sup>, Yu-Rim Lee<sup>1,5</sup>, Jong Cheol Kim<sup>3</sup>, Doobo Shim<sup>3</sup>,  
Kang-Hyun Chung<sup>1</sup>, Kwon-Jai Lee<sup>4</sup>, and Jeung Hee An<sup>5,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science & Technology

<sup>2</sup>Department of Biomedical Engineering, Sogang University

<sup>3</sup>Institute of Hadong Green Tea

<sup>4</sup>Department of H-Lac, Daejeon University

<sup>5</sup>Department of Food Science and Nutrition, KC University

**Abstract** This study investigated the antioxidant and nitric oxide (NO) inhibition effects of three domestic and seven foreign fermented black tea 70% ethanol extracts. Bosung showed the highest total polyphenol and tannin contents. Jeju showed the highest total flavonoid contents. The theanine content was higher in Hadong (651.50 mg%) than in foreign fermented black tea. At 25 µg/mL, the domestic fermented black tea extract showed the highest DPPH and ABTS radical-scavenging activities, reducing power assays. Domestic fermented black tea showed higher NO inhibitor activity than foreign black tea at 50 µg/mL. Bosung black tea extract showed an increase in SOD-1 level (1.39-fold) compared to the LPS-only group. Bosung and Jeju decreased the GST protein by 1.52- and 1.46-folds, respectively, compared to the LPS-only group. Thus our results suggest that domestic fermented black tea (Bosung, Jeju, and Hadong) are effective antioxidants in RAW 264.7 cells.

**Keywords:** domestic, foreign, fermented black tea, antioxidant effect, nitric oxide

## 서 론

생체 내에서 발생하는 활성산소(reactive oxygen species)와 활성질소종(reactive nitrogen species)은 함께 작용하여 세포의 손상을 야기한다고 알려져 있다(Jeon 등, 2012). 활성산소는 세포 손상을 초래하거나 염증반응을 유도하여 심장병, 관절염, 파킨슨병 등과 같은 여러 질환의 원인이 되며, DNA 손상에 따른 발암 과정에 관련성이 존재한다고 보고되어 있다(Valko 등, 2007). 또한, 활성질소종에 존재하는 과산화 질산염(ONOO<sup>-</sup>)의 전구체인 nitric oxide (NO)의 생성을 통해 조직손상이 유발된다(Ronzio, 2020). 생체 내에서 생성되는 free radical을 효율적으로 제거 가능한 항산화 효소계는 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPX), glutathione-s-transferase (GST) 등이 존재한다(Kim 등, 1997). 그중에서 SOD는 유리기가 생성되는 전구물질들의 불활성화를 이용하여 유리기를 억제 및 소거하여 분자상 산소를 통한 유리기 연쇄 반응을 차단하는 역할을 한다고 보고되

었다(Ryu 등, 2001). GST는 중금속 독성 발현에 영향을 주어 환원된 독성물질들이 glutathione과 결합하여 세포 내 돌연변이원이 독소와 발암물질을 제거하는 역할을 한다(Kang 등, 2001). 최근 에 천연물 소재를 이용한 항산화 관련 연구들이 다양하게 진행되고 있는 실정이다.

차는 차나무(*Camellia sinensis* L.)의 잎과 순을 제다한 것으로 발효 정도에 따라서 녹차(비발효), 백차(10% 미만 발효), 우롱차와 청차(15-60% 발효), 황차(70% 발효)와 홍차(85% 발효)로 분류될 수 있다(Kim 등, 2014). 비발효차인 녹차는 찻잎을 가열하여 효소의 활성을 정지시켜 제조한다. 반발효차는 수확한 찻잎을 위조조작을 통해 약 발효 후 효소 활성을 정지시키는 반면, 완전 발효차인 홍차는 위조 및 발효 공정을 통해서 효소 반응을 시켜 활성을 정지시킨다(Cho 등, 2007b). 찻잎은 폴리페놀 성분인 카테킨, 플라보노이드 등이 비교적 많이 함유되어 있으며, 테아닌,  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), 비타민, 사포닌 및 미량무기질 등의 성분을 함유하고 있다(Kang, 2011). 이러한 차 성분들은 항산화 효과(Kang, 2011), 항비만 효과(Jeon 등, 2005), 항균효과(Yeo 등, 1995), LDL cholesterol 억제 효과(Koh, 2000), 노화 억제 효과(Kim 등, 2011) 등의 효능을 가지고 있다고 보고되었다. 현재 세계 차 산업은 산화효소 발효차인 홍차가 주도하고 있으나 국내 산 홍차가 외국산 홍차에 비해 품질 경쟁이 낮아 우리나라의 차 시장은 수입에 의존하고 있는 추세이다(Shim 등, 2018). 이에 국

\*Corresponding author: Jeung Hee An, Department of Food and Nutrition, KC University, Seoul 07661, Korea  
Tel: +82-2-2600-2566  
E-mail: anjhee@hanmail.net  
Received May 28, 2021; revised June 30, 2021;  
accepted July 1, 2021

내산 홍차와 외국산 홍차의 항산화 및 항염증 효과를 비교 분석한 연구는 미비한 상태이다.

따라서 본 연구에서는 국내산 홍차 3종과 외국산 홍차 7종을 70% 에탄올 추출물로 제조하여 항산화 성분 및 활성을 비교하여 측정하였다. 대식세포인 RAW 264.7 세포 내에서의 면역증진 효과와 LPS를 첨가하여 염증반응을 유도한 후에 NO 생성 저해능과 항산화 관련 단백질 발현 역시 비교 분석하였다. 이를 통해서 국내산 홍차 추출물이 항산화 능력을 가진 기능성 식품소재로서의 개발 가능성을 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 추출물 제조

본 실험에서의 국내산 홍차는 하동녹차연구소(Hadong, Korea)를 통해 받았고 외국산 홍차는 (주)에스앤피(Gyeonggi-do, Korea) 회사에서 받아서 분석하였다. 사용된 추출물은 홍차 잎의 건조 시료를 70% 에탄올에 1:5 비율로 혼합하여 실온에서 24시간 진탕한 후 여과지(Whatman No. 2, What-man plc., Kent, UK)를 이용하여 여과하였다. 여과한 추출물은 회전진공농축기(R-114, Buchi Co., Flawil, Switzerland)를 사용하여 농축시킨 후 원심 진공 농축기(BioTron Inc., Gyeonggi-do, Korea)로 남은 용매를 건조하고 냉동고(-70°C)에 시료를 보관하여 사용하였다.

### 세포배양

RAW 264.7 세포주를 한국세포주은행(KCLB, Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 분양받아 100 U/mL penicillin과 100 mg/mL streptomycin(Welgene, Daegu, Korea)과 10%의 fetal bovine serum (HyClone, Logan, UT, USA)이 함유된 DMEM 배지(Welgene)를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였다.

### 총 폴리페놀, 총 플라보노이드, 총 탄닌 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis (Singleton과 Rossi, 1965)의 방법을 이용하여 측정하였다. 1 mg/mL로 희석한 시료 100 µL에 물 2 mL와 2N Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 200 µL에 첨가한 뒤에 상온에서 3분간 반응시켰다. 반응 후에 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd., Siheung, Korea) 2 mL를 첨가 후 1시간 동안 방치시킨 후 ELISA reader (UVM 340, Biochrom Ltd., Cambridge, UK)를 사용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 gallic acid (Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 총 폴리페놀 함량을 구하였고 추출물 1g 당 mg gallic acid equivalent (GAE, dry basis)로 함량을 산출하였다.

총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등(1999)의 방법을 이용하여 측정하였다. 1 mg/mL로 희석한 시료 100 µL에 5% NaNO<sub>2</sub> (Daejung Chemicals & Metals Co.) 용액 30 µL과 증류수 400 µL을 넣은 후 상온에서 5분간 반응시켰다. 이후 30 µL의 10% AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (Daejung Chemicals & Metals Co.) 용액을 첨가하고 상온에서 6분간 반응 후, 1 M NaOH (Daejung Chemicals & Metals Co.) 200 µL과 증류수 240 µL을 첨가하여 11분 동안 발색 후 510 nm에서 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 (+)-catechin hydrate (Sigma-Aldrich Co.)를 이용하여 표준 곡선을 산출하였고 추출물 1g당 mg (+)-catechin hydrate equivalent (CE, dry basis)로 나타내었다.

총 탄닌 함량은 Duval 등(1999)의 방법을 이용하여 측정하였다. 1 mg/mL로 희석한 시료 1 mL와 95% ethanol 1 mL에 증류수

1 mL을 혼합한 후 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Daejung Chemicals & Metals Co.) 용액 1 mL와 1N Folin-ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich Co.) 0.5 mL를 첨가한 후에 60분간 상온에서 발색시켰다. 발색 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 Tannic acid (Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 총 탄닌 함량을 구하였으며, 결과는 추출물 1g당 mg tannic acid equivalent (TAE, dry basis)로 나타내었다.

### 테아닌 함량 분석

테아닌 함량은 시료 0.1 g에 증류수 10 mL을 가한 다음 3시간 동안 진탕시켜 10% 5-sulfosalicylic acid dihydrate (Sigma-Aldrich Co.) 1 mL을 첨가해 12시간 동안 5°C에 방치시켜 단백질을 침전 및 제거하고, 400 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 감압농축기(rotary evaporator, EYELAN-1100V-W, Tokyo, Japan)로 농축하였다. 다음으로 0.2 M, pH 2.2 lithium citrate loading buffer 5 mL을 가하여 희석한 후 0.45 µm membrane filter로 여과한 여액을 아미노산 분석기(Skyam S7130, Amino acid reagent organize, Darmstadt, Germany)를 이용하여 UV/VIS detector 400 nm (1.0 AU)에서 RT (retention time)는 40.2분에서 동정된 값으로 분석하였다(Shim 등, 2019).

### DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 Blois(1958)의 연구 방법을 변형하여 측정하였다. 5, 10, 25 µg/mL로 희석한 홍차 추출물 200 µL을 0.2 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich Co.)을 가하여 200 µL 1:1로 혼합 후 암소에서 30분간 반응하여 ELISA reader (Biochrome Ltd.)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과 값을 추출물 첨가군과 무첨가군을 비교하여 농도에 따른 DPPH의 라디칼 소거능을 백분율(%)로 나타내었다.

### ABTS 라디칼 소거능 측정

2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) 라디칼 소거능은 Re 등(1999)의 방법을 변형하여 사용하였다. 7 mM ABTS (Sigma-Aldrich Co.) 용액 5 mL에 2.45 mM potassium persulfate (Hayashi Pure Chemical Ind. Ltd., Osaka, Japan) 5 mL를 혼합하여 암소에서 약 24시간 반응시켰다. 이 ABTS solution을 734 nm에서 흡광도가 0.70±0.02가 되도록 phosphate buffer saline (pH 7.4)으로 희석하여 사용하였다. 희석된 ABTS solution 800 µL을 70% 홍차 에탄올 추출물 5, 10, 25 µg/mL 농도로 희석한 시료를 200 µL 혼합하여 암소에서 6분간 반응 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 라디칼의 소거 활성을 추출물 첨가 군과 대조군인 L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich Co.)를 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.

### 환원력 측정

홍차 추출물의 환원력은 Oyaizu(1986)의 방법을 변형하여 측정하였다. 5, 10, 25 µg/mL 농도로 제조된 시료에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)와 1% potassium ferricyanide (Chameleon Analytical Reagent, Osaka, Japan)를 혼합한 후 50°C에서 20분 동안 반응시켰다. 여기에 10% trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich Co.)를 가하여 원심분리 후 상층액 500 µL에 증류수 600 µL과 0.1% ferric chloride (Sigma-Aldrich Co.) 용액 100 µL을 반응시킨 후에 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 환원력은 흡광도 값으로 표기하였다.

### RAW 264.7 세포의 세포독성 평가

RAW 264.7 세포의 세포독성 평가는 Mosmann(1983)의 방법을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포  $1 \times 10^5$  cells/well로 200  $\mu$ L씩 96 well plate에 분주 후 37°C의 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 시간 동안 배양하였다. 50, 100, 200  $\mu$ g/mL 농도로 시료를 처리하고 24시간 동안 배양 후 각 well에 5 mg/mL의 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT (Promega, Madison, WI, USA) 을 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 그 후 상등액을 제거하고 생성된 formazan 결정을 dimethyl sulfoxide (Biosesang, Sungnam, Korea)로 녹인 후에 ELISA reader (Biochrome Ltd.)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성 평가는 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율(%)로 나타내었다.

### Nitric Oxide (NO) 생성 저해능

NO 생성 저해능은 Griess 원리를 기반으로 만들어진 NO Plus Detection kit (21023, iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 cell을  $1 \times 10^5$  cells/well로 200  $\mu$ L씩 96 well plate에 분주 후 37°C의 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하였고 1  $\mu$ g/mL LPS가 포함된 배지로 교환 후, 시료를 농도별로 각각 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 시료를 농도별로 첨가한 세포의 배양 상등액 100  $\mu$ L을 새로운 96 well plate에 옮겼다. 상등액에 50  $\mu$ L의 N1 buffer (Sulfanilamide in the reaction buffer, iNtRon Biotechnology, Seongnam, Korea)를 첨가 후 10분간 상온에서 반응 후 N2 buffer (Naphthylethylenediamine in the stabilizer buffer, iNtRon biotechnology)를 50  $\mu$ L 넣고 10 분간 상온에서 반응시켰다. ELISA reader (Biochrome Ltd.)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitric Oxide 생성 저해능은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율(%)로 나타내었다.

### Western Blotting Analysis

RAW 264.7 cell을  $1 \times 10^5$  cells/well로 100 mm cell culture dish에 분주 후 37°C의 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하고 1  $\mu$ g/mL LPS가 포함된 배지로 교환하였으며 50  $\mu$ g/mL 농도의 시료를 첨가하여 24시간 동안 처리 후 세포에서 단백질을 추출하였다. 세포에 RIPA lysis buffer 함유된 protease inhibitors (Roche, Mannheim, Germany)를 첨가 후 원심분리기에서 4°C, 10,000×g, 30분간 진행하였고. Bio-Rad protein kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 총 단백질 함량을 정량하였다. 정량한 단백질 상층액을 10% SDS-PAGE (Bio-Rad)하여 분리하고 power supply electrophoresis (Bio-Rad)를 이용하여 Immobilon-P transfer membrane (EMD Millipore Co., Bedford, MA, USA)에 옮긴 후 5% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Co.)에서 고정작업을 진행하였다. 1차 항체는  $\beta$ -actin, GST(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), SOD-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을 사용하였다. 2차 항체로는 goat anti rabbit immunoglobulin G (H+L) horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Zymax, San Francisco, CA, USA)로 사용하였다. 단백질 분석은 C DiGit Blot Scanner (Li-COR, Lincoln, NE, USA)와 Image J (NIH, Rockville, MD, USA)를 사용하여 진행되었다. 모든 데이터는  $\beta$ -actin을 기준으로 계산되었다.

### 통계분석

본 연구의 모든 분석은 3회 반복하여 평균±표준편차(mean±SD)

로 제시하였다. 실험값에 대한 통계분석은 SPSS 18.0 (SPSS Ins., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 분산분석(ANOVA)법을 실행하였고 실험군 간의 유의성은 Duncan's multiple range test로  $p < 0.05$  수준에서 유의적 차이를 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 총 폴리페놀, 총 플라보노이드와 총 탄닌 및 테아닌 함량

플라보노이드류, 페놀산류 및 식물성 에스트로젠류를 포함하는 총 페놀 화합물은 수소 공여로 라디칼 반응과 공명 구조를 통해 안정화되면서 산화를 방지하여 항산화 활성 및 항노화 등과 같은 생리효과를 나타내는 것으로 보고되었다(Limón-Pacheco와 Gonsebatt, 2009). 본 연구에서는 국내산 3종과 외국산 7종을 이용하여 총 폴리페놀, 플라보노이드와 탄닌 함량을 측정하였고, 이는 Table 1에 나타내었다. 70% 홍차 에탄올 추출물의 국내산 홍차의 총 폴리페놀 함량은 보성과 제주도, 하동 홍차에서 각각 330.13, 258.59, 206.03 mg GAE/g 순으로 낮아지는 것으로 나타났다. 국내산보다 외국산 홍차인 스리랑카 누와라엘리아와 인도 아쌈 망갈라라 각각 477.31, 466.54 mg GAE/g로 홍차 추출물 중 가장 높은 함량을 보였고 두 시료 간의 유의적 차이는 존재하지 않았다. Jeong 등(2009)의 스리랑카 홍차추출물은 72.03 mg/g로 나타났고 Kim 등(2012)의 중국 운남성 보문 홍차는 106.2 mg/g으로 나타나 외국산 홍차에 비해 본 연구의 국내산 홍차 추출물이 높게 나타났다. 또한, 본 연구에서의 외국산 홍차는 국내산 홍차에 비해 높은 폴리페놀 함량을 보여주었다. 이는 국내산 홍차가 발효되는 과정에서 polyphenol oxidase 등의 효소 작용을 통해서 페놀성 화합물이 변환되거나 축합되어 폴리페놀 함량이 감소된 것으로 보여진다(Ban 등, 2018; Nakgawa M, 1967).

일반적으로 차에 함유된 플라보노이드는 항산화 활성과 항염증 및 면역 활성 등의 다양한 역할을 하는 대표적인 성분으로 알려졌다(Ban 등, 2018). 국내산 홍차인 제주는 590.11 mg CE/g으로 국내산 홍차 중에서 가장 높은 함량을 보였고 외국산과 비교 시 인도 아쌈 망갈라라가 615.67 mg CE/g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 그러나 제주와 인도 아쌈 망갈라라 시료 간의 유의적 차이가 나타나지 않았다. Kim과 Kim(2019)의 연구에서 에탄올, 아세톤 등의 유기용매가 수용성 용매보다 비 플라보노이드 유도체가 높게 추출되는 것으로 보고되었다. 열수 추출물인 Ban 등(2018)의 보성 홍차(264.56 mg CE/g)와 Jeong 등(2009)의 스리랑카 홍차(115.59 mg/100 g)보다 본 연구의 70% 에탄올 추출물의 플라보노이드 함량이 더 높은 것으로 나타났다. 이는 추출 용매에 의한 차이로 보인다.

탄닌 함량은 국내산 홍차에서 보성(285.65 mg TAE/g) > 하동(215.82 mg TAE/g) > 제주도(174.25 mg TAE/g) 순으로 나타났다. 외국산 홍차인 스리랑카 누와라엘리아, 인도 아쌈 망갈라라와 스리랑카 우비의 탄닌 함량이 각각 356.58, 354.60, 347.75 mg TAE/g으로 높은 함량을 보였고 세 시료 간의 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 외국산 홍차가 국내산 홍차보다 높은 탄닌 함량을 함유하는 것으로 나타났다. 이는 찻잎의 품종과 채취 시기, 찻잎의 경화도 등 주위 환경의 차이에 의한 것으로 보인다(Yang 등, 2012). Lee 등(2020)의 국내산 녹차인 보향과 참녹 녹차 열수 추출물의 탄닌 함량은 17.3-18.5 mg/g으로 보고되었다. 이와 비교 시 국내산 홍차 추출물인 보성, 하동과 제주 홍차 추출물은 기존에 보고된 Lee 등(2020)의 연구보다 더 높은 탄닌 함량을 함유하여 본 연구의 녹차가 더 높은 떫은맛을 함유하는 것으로 보인다.

찻잎에 존재하는 theanine, glutamic acid와 arginine 등이 존재

**Table 1.** Comparison of total polyphenol, flavonoid, and tannin contents of various extract fraction of black tea

Sample		Total phenolic (mg GAE <sup>1)</sup> /g)	Total flavonoid (mg CE <sup>2)</sup> /g)	Tannin (mg TAE <sup>3)</sup> /g)	Theanine (mg%)
National	Area				
Korea	Hadong	206.03±3.47 <sup>24)5)</sup>	190.11±1.92 <sup>d</sup>	215.82±16.71 <sup>e</sup>	651.50±7.02 <sup>a</sup>
	Jeju	258.59±11.97 <sup>e</sup>	590.11±50.15 <sup>e</sup>	174.25±2.44 <sup>f</sup>	27.43±0.69 <sup>j</sup>
	Bosung	330.13±1.18 <sup>d</sup>	264.56±5.09 <sup>d</sup>	285.65±9.24 <sup>b</sup>	556.10±12.15 <sup>b</sup>
China	Keemun	228.85±4.28 <sup>f</sup>	337.89±56.21 <sup>c</sup>	149.86±1.86 <sup>g</sup>	359.53±2.36 <sup>d</sup>
	Lapsang Souchong	262.18±5.82 <sup>e</sup>	247.89±3.85 <sup>d</sup>	167.87±1.47 <sup>f</sup>	399.40±3.04 <sup>e</sup>
India	Darjeeling	435.26±8.75 <sup>c</sup>	386.78±10.72 <sup>c</sup>	271.91±1.07 <sup>c</sup>	312.23±3.32 <sup>e</sup>
	Assam Mangalam	466.54±13.91 <sup>ab</sup>	615.67±10.00 <sup>a</sup>	354.60±2.24 <sup>a</sup>	239.87±1.89 <sup>f</sup>
Sri Lanka	Uva	462.95±11.57 <sup>b</sup>	509.00±92.44 <sup>b</sup>	347.75±0.30 <sup>g</sup>	209.87±3.67 <sup>g</sup>
	Nuwara Eliya	477.31±5.04 <sup>a</sup>	347.59±22.19 <sup>c</sup>	356.58±0.41 <sup>a</sup>	184.70±2.62 <sup>h</sup>
Vietnam	Ha Giang	326.03±1.18 <sup>d</sup>	347.59±50.04 <sup>c</sup>	238.46±4.21 <sup>d</sup>	135.17±3.59 <sup>i</sup>

<sup>1)</sup>Total phenolic content was expressed as mg/g gallic acid equivalent (GAE).  
<sup>2)</sup>Total flavonoid content was expressed as mg/g catechin equivalent (CE).  
<sup>3)</sup>Tannic acid content was expressed as mg/g tannic acid equivalent (TAE).  
<sup>4)</sup>Each value is mean±SD of triplicate determinations (n=3).  
<sup>5)</sup>Means with different letters (a-j) within a column are significantly different at *p*<0.05.

하는데 그 중 theanine은 찻잎의 60%를 차지하며, theanine의 함량 및 기타 아미노산 총 함량이 많을수록 맛이 좋아진다고 보고되었다(Cho 등, 2007a). 찻잎의 주요 기능 성분인 테아닌은 염증을 억제하고 조직 손상 개선을 통해서 항염증 및 항산화 작용을 한다고 보고되었다(Wang 등, 2018). 본 연구의 테아닌 함량은 국내의 홍차 추출물 시료 중에서 하동과 보성 홍차가 651.50 mg%와 556.10 mg%로 외국산 홍차보다 높은 함량을 나타내었다. Shim 등(2019)의 결과에 의하면 하동 비차광 말차에서 470 mg%의 테아닌 함량을 보였고 Cho 등(2007a)의 연구에 의하면 경남 하동군 차의 발효 시간을 다르게 진행하였을 때 테아닌 함량이 75.67-52.29 mg%를 나타내었다. 또한, Lee 등(2020)의 연구에서 채취시기에 따른 녹차의 테아닌 함량은 149-377 mg%를 보여주었다. Choi와 Choi(2003)의 결과에 의하면 찻잎의 발효 정도가 증가할수록 테아닌 함량이 증가되는 것으로 보고되었다. 이 결과를 통해서 본 연구의 국내산 하동 홍차 추출물의 테아닌 함량이 하동 비차광 말차(Shim 등, 2019), 경남 하동군 차(Cho 등, 2007a)와 채취시기에 따른 녹차(Lee 등, 2020)보다 각각 1.4배, 8.6-12.5배, 4.4-1.7배 증가한 것은 발효과정 차이에 의한 것으로 보여진다.

본 연구에서 총 폴리페놀, 플라보노이드, 탄닌 함량은 국내산 홍차인 보성과 제주에서 높은 함량을 함유하였고 테아닌 함량은 하동 홍차에서 높은 함량을 보여주었다. 이는 차의 품종, 찻잎의 채취 시기, 재배지의 토양 성질과 제다 방법 등의 조건 차이에 의해 찻잎에 함유되어 있는 성분들이 변화된 것으로 보여진다(Ban 등, 2018; Yang 등, 2012; Choi와 Choi, 2003).

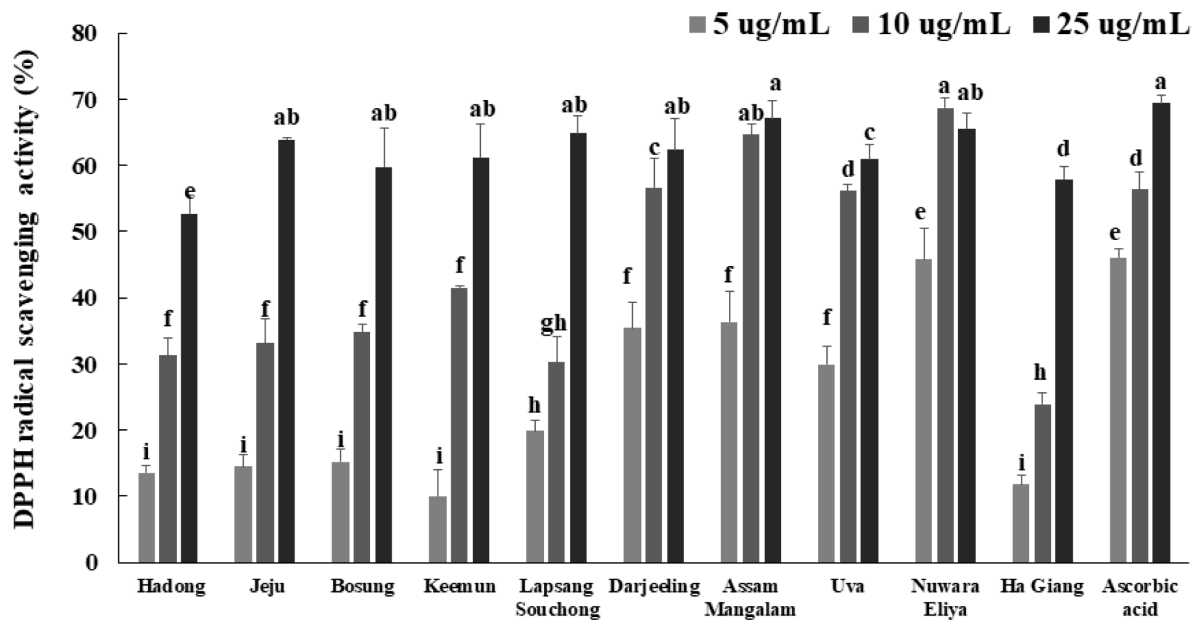
**DPPH 라디칼 소거능의 변화**

DPPH 라디칼 소거능은 인체의 노화 억제 및 식품의 지방질 산화를 억제하는 것과 관련성이 있는 것으로 보고되었다(Kim 등, 2019). 홍차 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. DPPH 라디칼 소거능은 모든 시료에서 5-25 µg/mL의 농도가 증가함에 따라 증가하는 것으로 보였다. 25 µg/mL 농도에서 제주와 보성이 63.89%와 59.73%로 대조군인 ascorbic acid와 유의적 차이가 없는 것으로 보아 매우 우수한 것으로 보인다. 또한, 25 µg/mL 농도에서 스리랑카 우바(60.86%)와 베트남 하장

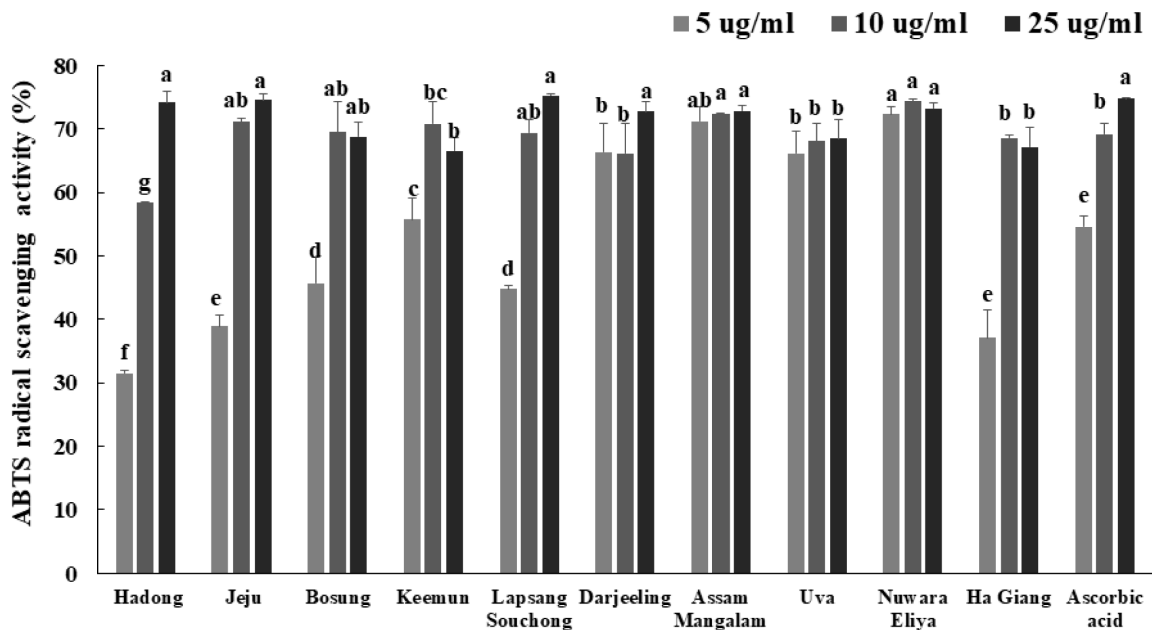
(57.86%)은 유의적으로 DPPH 라디칼 소거능 활성이 감소하는 것으로 나타났다. 국내산 홍차 추출물은 10 µg/mL의 농도에서 외국산 홍차 추출물보다 활성이 감소하는 것을 보였다. 하지만 Shim 등(2018)은 제주 홍차 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정된 결과, 0.5 mg/mL 농도에서 40.2-43.0%의 활성을 나타냈고 Jeong 등(2010)의 어성초 추출물은 20 µg/mL 농도에서 16.90%의 DPPH 라디칼 소거 활성을 보여 본 연구의 제주와 보성 홍차 추출물의 항산화 활성이 매우 우수함을 알 수 있었다. 따라서 본 연구의 홍차 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 찻잎에 존재하는 폴리페놀, 플라보노이드, 테아닌 함량과 밀접한 상관관계가 있는 것으로 보여진다(Ban 등, 2018; Wang 등, 2018).

**ABTS 라디칼 소거능의 변화**

ABTS 라디칼은 물과 유기용매를 통해서 용해될 수 있기 때문에 친수성 및 친유성 화합물의 산화방지력을 측정하는 데 효과적이라고 보고되었다(Park 등, 2017). 70% 홍차 에탄올 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성은 Fig. 2에 나타내었다. 홍차 추출물은 5-25 µg/mL의 농도가 증가함으로써 ABTS 라디칼 소거능이 31.55-75.22%로 증가하였다. 25 µg/mL 농도에서 제주, 하동과 보성 홍차 추출물에서 각각 74.54, 74.17, 68.82%로 대조군인 ascorbic acid와 유사하게 높은 ABTS 라디칼 활성을 보였다. 10 µg/mL 농도에서 제주(71.13%)와 보성 홍차(69.50%)가 대조군인 ascorbic acid보다 유의적으로 높은 활성을 나타냈다. 국내산과 비교 시 외국산 홍차인 스리랑카 누와라엘리아와 인도 아삼 망갈라는 전체 농도에서 우수한 ABTS 라디칼 소거능을 보였다. 이는 차나무 품종 차이에 의한 것으로 보인다(Shim 등, 2018). Jeong 등(2009)의 연구에 의하면 우전 녹차, 중국산 보이차, 우롱차 및 스리랑카산 홍차 열수 추출물은 250 µg/mL 농도에서 92.09-48.07%의 ABTS 활성이 존재하였고 Shim 등(2018)의 제주 홍차 열수 추출물은 0.25 mg/mL에서 ABTS 라디칼 소거능이 50.4-80.5%의 활성을 보였고, Rho 등(2015)의 매화 잎 클로로포름 추출물은 200 µg/mL 농도에서 82.78%를 보였다. 따라서 본 실험에서의 국내산 홍차는 Jeong 등(2009)의 우전 녹차, 중국산 보이차, 우롱차 및 스리랑카산 홍차와 Shim 등(2018)의 제주 홍차 및 Rho 등(2015)의 매



**Fig. 1.** DPPH radical scavenging activity of various extract fraction of black tea. Values with different superscripts within a column were significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). Each value is mean  $\pm$  standard deviations ( $n=3$ ).



**Fig. 2.** ABTS radical scavenging activity of various extract fraction of black tea. Values with different superscripts within a column were significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). Each value is mean  $\pm$  standard deviations ( $n=3$ ).

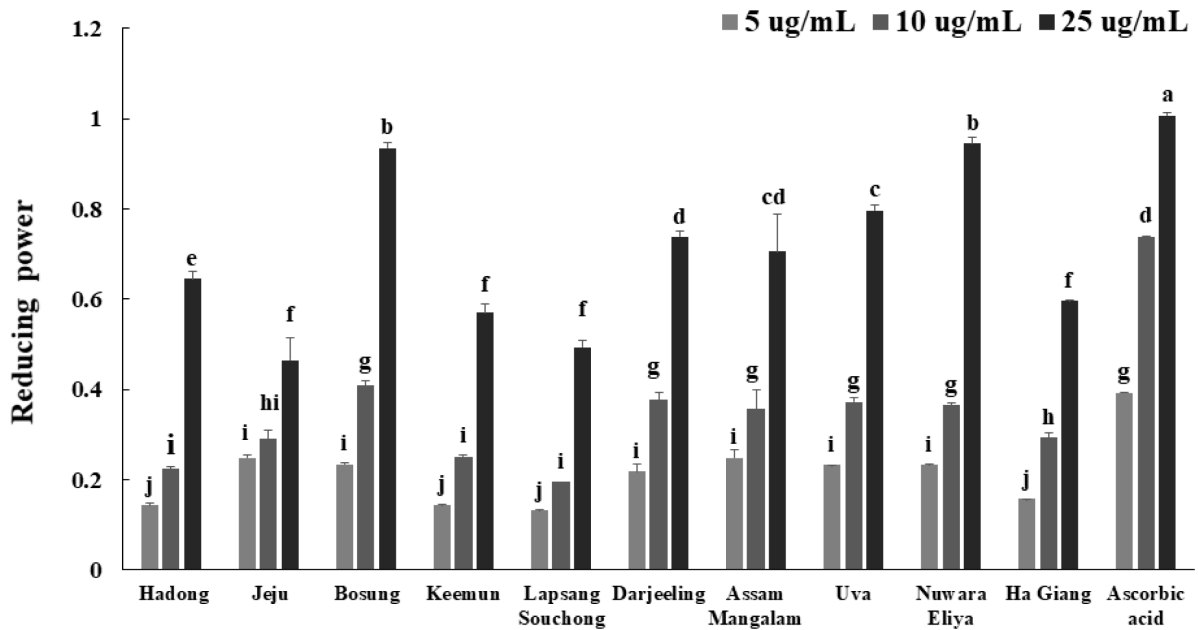
화 잎보다 더 낮은 농도에서 높은 ABTS 소거 활성이 존재하는 것으로 나타났다.

항산화 활성은 폴리페놀 함량 및 플라보노이드의 상관관계가 있다고 알려져 있으므로(Bae 등, 2019) 본 연구에서도 DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능이 총 폴리페놀과 관련성이 있는 것으로 보인다.

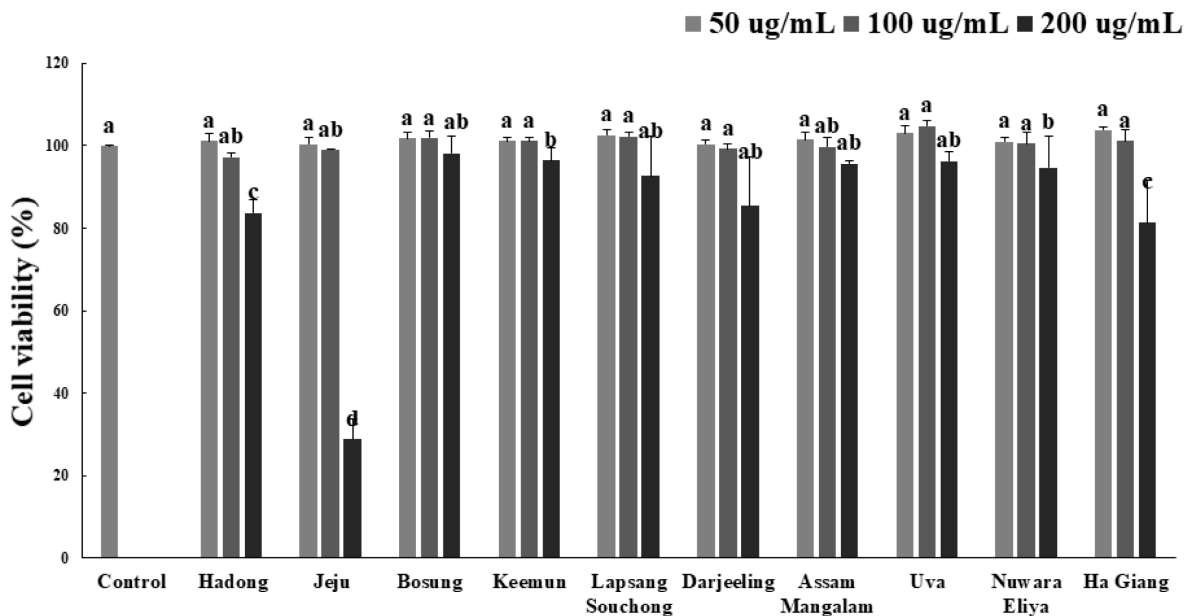
#### 환원력 측정

Ferric-ferricyanide 혼합물이 수소를 공여하여 유리 라디칼을 안정화해 ferrous로 전환하는 환원력은 항산화 활성과 직접적인 관

련성이 존재한다고 보고되었다(Lee 등, 2018). 홍차 추출물의 환원력은 5, 10, 25 µg/mL 농도에서 측정하였다(Fig. 3). 홍차 70% 에탄올 추출물은 농도가 증가함에 따라 환원력이 증가하는 것을 보였다. 25 µg/mL 농도의 홍차 추출물에서는 국내산 보성과 스리랑카 누와라엘리아 홍차 추출물에서 각각 0.935와 0.945로 가장 높은 함량을 보였고 두 시료 간의 유의적 차이를 나타내지 않았다. 25 µg/mL 농도에서 국내산 홍차 추출물의 환원력은 보성(0.935), 하동(0.645)과 제주(0.464) 순으로 낮아지는 경향을 나타내었다. Rho 등(2015)의 연구 결과에서 800 µg/mL의 매화 잎에 틸아세테르 추출물은 0.781의 환원력을 보여주었고, Park 등(2017)



**Fig. 3.** Reducing power of various extract fraction of black tea. Values with different superscripts within a column were significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). Each value is mean  $\pm$  standard deviations ( $n = 3$ ).



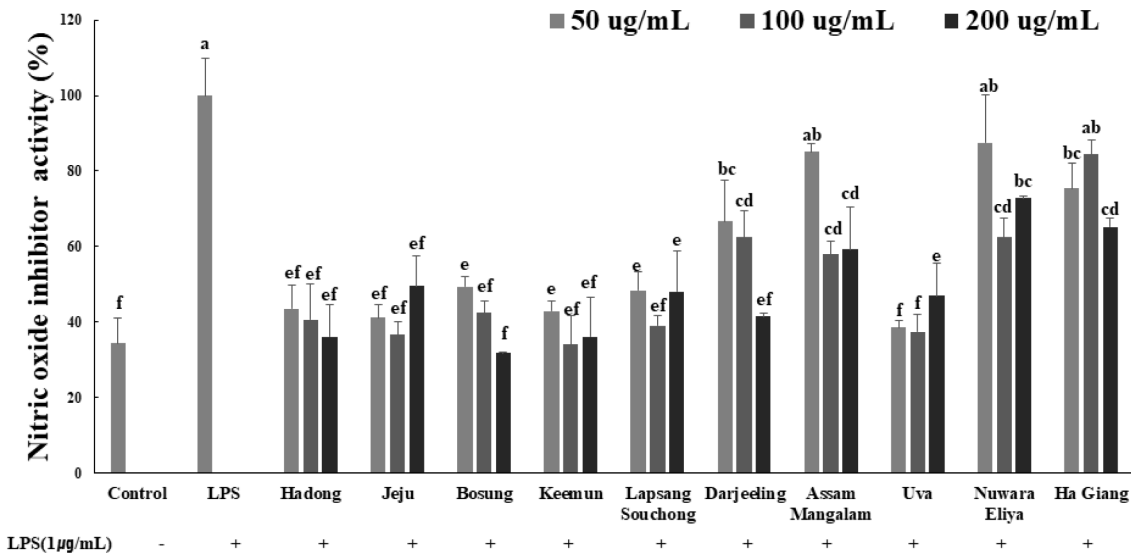
**Fig. 4.** Cell viability in black tea extracts. Values with different letters above the bars were significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Each value is mean  $\pm$  standard deviations ( $n = 3$ ).

의 연구에 의하면 1,000 µg/mL 농도의 와송 아세트산에틸 분획물이 1.77의 환원력을 보였다. 이를 통해서, 본 연구의 국내산 보성 홍차의 높은 환원력은 높은 폴리페놀 성분에 의한 것으로 보인다.

**RAW 264.7 세포의 세포독성 평가**

홍차 추출물을 50-200 µg/mL 농도를 첨가하였을 때 대식세포에서의 세포독성 평가는 Fig. 4와 같다. 200 µg/mL 농도에서 제주도(28.75%)를 제외한 모든 추출물에서 높은 세포 생존율을 보여주었다. 그중 보성 홍차가 98.22%로 가장 높은 세포 보호 효과를 보였고 대조군과 유의적 차이가 나타나지 않았다. 50-100

µg/mL 농도에서는 모든 홍차 추출물이 대조군인 control과 유사한 면역 활성을 보였고 국내산 홍차 추출물인 보성 > 제주도 > 하동 순으로 높은 세포 보호 효과를 보였다. 본 연구에서 홍차 추출물은 항산화 성분이 모든 추출물에서 높았던 것으로 보아 50, 100 µg/mL 농도에서 국내산 홍차 추출물은 보성, 제주, 하동 순으로 대식세포의 세포 보호 효과를 보인 것으로 사료된다. RAW 264.7 세포의 세포독성 평가에서 200 µg/mL 농도의 전나무 잎에 탄을 추출물은 52.67%를 나타냈다(Choi 등, 2020). 이와 비교했을 때 본 연구의 국내산 홍차 추출물의 세포 보호 효과 존재하는 것으로 보인다.



**Fig. 5. Inhibitory effects of black tea extracts on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages cells.** Values with different letters above the bars were significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Each value is mean  $\pm$  standard deviations ( $n=3$ ).

### Nitric Oxide (NO) 생성 저해능

L-Arginine을 통해 nitric oxide synthase (NOS)를 생성하는 NO는 세균, 곰팡이와 종양을 사멸시키는 기능이 존재하지만, 과도한 NO 생성은 세포 내 염증 유발, 조직 손상, 유전자 변이 등의 원인이 된다(Cho와 Ahn, 2008). RAW 264.7 세포에 1 µg/mL의 LPS를 24시간 처리하여 NO를 유발한 뒤 50-200 µg/mL 홍차 추출물을 첨가했을 때의 NO 생성 저해능은 Fig. 5에 나타내었다. LPS에 의해 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에서의 NO 생성 저해능은 LPS 무처리군과 비교했을 때 60% 정도 증가하여 LPS 단독 처리군에서 염증이 유발된 것을 보여주었다. 50-200 µg/mL 농도에서 하동, 보성과 인도 다즐링은 농도 의존적으로 NO 생성 저해능이 감소되는 것으로 나타났다. 50 µg/mL 농도에서 국내산 홍차 추출물인 제주도과 하동 홍차는 각각 41.17%와 43.57%로 LPS 무처리군(34.27%)과 유의적으로 차이가 없는 활성을 보여주었다. 100 µg/mL 농도에서는 모든 국내산 홍차 추출물인 제주, 하동, 보성(36.68-42.42%)과 외국산 홍차 추출물인 중국 기문, 중국 금준미, 스리랑카 우바(34.01-38.98%)의 NO 생성 저해능은 대조군인 LPS 무 처리군과 유사한 활성을 나타내었다. 200 µg/mL에서 보성(31.82%)과 인도 다즐링(41.38%)이 LPS 무처리군과 유사한 활성이 존재하였다. 이에 국내산 홍차 추출물은 외국산 홍차에 비해 모든 농도에서 NO 생성 저해능이 존재하는 것으로 보여진다. Wang 등(2018) 연구에 의하면 차잎에서 발견되는 비단백질성 아미노산인 테아닌은 LPS에 의해 생성되는 급성 간 손상, 염증, 면역 불균형 및 산화스트레스를 개선한다고 보고되었다. 따라서 본 연구의 국내산 홍차 추출물이 외국산 홍차 추출물보다 높은 NO 생성 저해능을 보인 것은 테아닌 성분 때문인 것으로 보인다.

### RAW 264.7 세포에서 홍차추출물이 항산화 효소에 미치는 영향

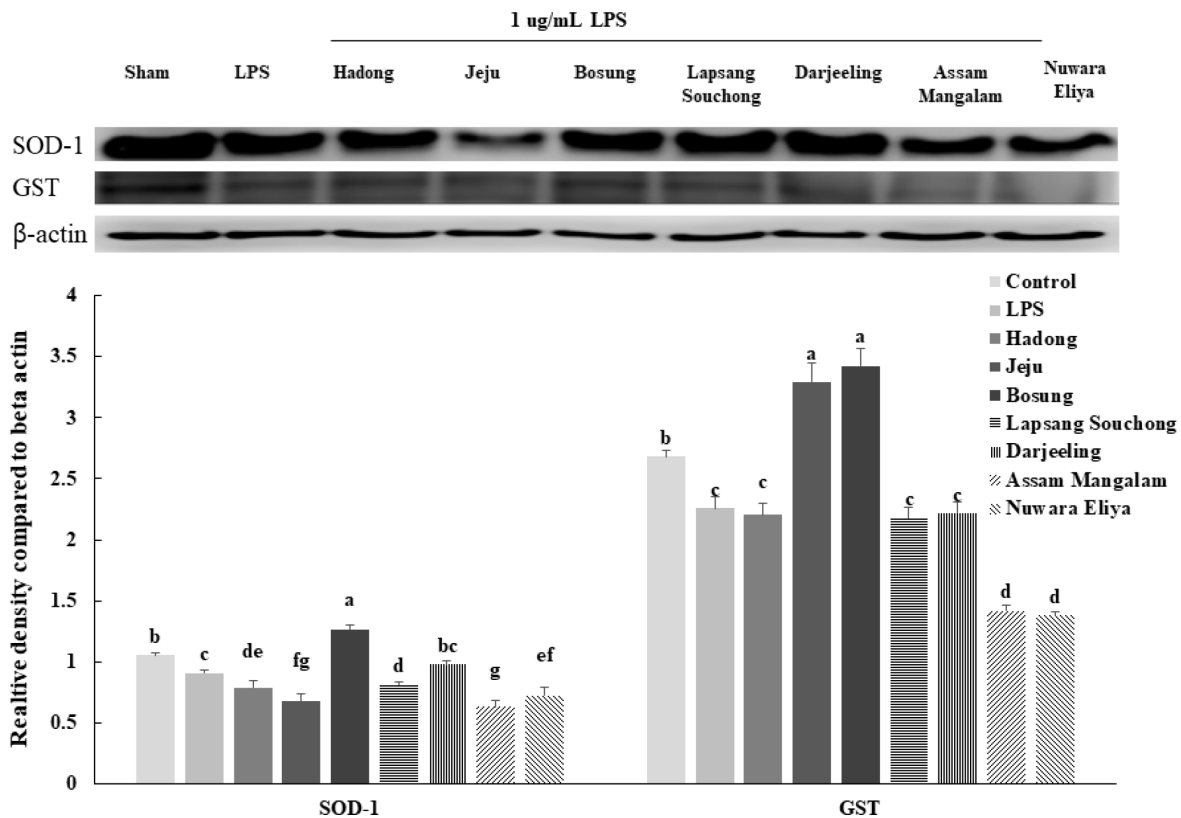
본 연구에서는 홍차 추출물의 항산화 효소의 발현을 확인하기 위해서 LPS (1 µg/mL)로 자극한 대식세포에서 국내산 홍차 3종과 외국산 홍차 4종 70% 에탄올 추출물을 50 µg/mL 농도로 처리한 항산화 기전(SOD-1와 GST) 발현을 Fig. 6에 나타내었다. 세포실험은 80% 이상의 세포 보호 효과와 높은 NO 생성 억제 활

성을 보인 50 µg/mL 농도로 진행하였다. LPS에 의해 염증반응이 유발된 대식세포에서의 SOD-1 단백질 발현은 LPS 무처리군에 비해 1.16배 감소하였다. 홍차 추출물 중에서 보성이 LPS 단독 처리군보다 1.39배 증가하는 경향을 보여 항산화 활성이 가장 우수하였다. 보성을 제외한 홍차 추출물은 LPS 무처리군보다 낮은 발현을 보였고 그중 인도 다즐링은 LPS 처리군에 비해 1.07배 증가되었다. Superoxide dismutase (SOD)는 과산화수소의 세포산화 대사에 의한 과산화물 분해의 핵심 효소로 작용된다(Fridovich, 1978). 이를 통해서 본 연구의 홍차 추출물 중 보성 홍차의 염증반응이 생성된 대식세포에서의 높은 항산화 효소 발현을 나타낸 것으로 보아 차잎에 존재하는 페놀성 화합물(Yan 등, 2020; Rahman 등, 2018) 및 테아닌 함량(Wang 등, 2018)이 세포 내에서의 항산화 효소 발현과 밀접한 상관관계가 있는 것으로 보여진다.

다형성 II 단계 대사 효소인 glutathione S-transferases (GSTs)는 다양한 유독성의 환경 화합물을 제거와 산화스트레스로부터 세포를 보호하는 기능을 한다고 알려져 있다(Hayes 등, 2005). 본 연구에서의 GST 발현은 LPS 단독 처리군이 LPS 무 처리군에 비해 1.19배 낮은 함량을 보였다. 홍차 추출물 중에서 보성과 제주가 각각 1.52배, 1.46배로 LPS 단독 처리군보다 GST 발현이 증가하였다. 그중 외국산 홍차인 스리랑카 누와라엘리아와 인도 아쌌 망갈라는 LPS 단독 처리군에 비해 각각 1.64배, 1.59배 감소된 것을 확인하였다. 본 연구의 결과에서 국내산 홍차는 외국산 홍차보다 항산화 성분 함량은 낮지만, 항산화 단백질 발현에서 국내산 홍차인 보성과 제주에서 높은 항산화 효과를 확인하였다. 이를 통해서 국내산 홍차가 기능성 식품 소재로서의 개발 가능성을 보여주었다.

## 요 약

본 연구에서는 국내산 홍차 3종과 외국산 홍차 7종의 70% 에탄올 추출물의 항산화 효과와 LPS로 유도된 대식세포에서의 항염증 보호 효과를 평가하였다. 국내산 홍차인 보성에서 총 폴리페놀(330.13 mg GAE/g)과 탄닌(285.65 mg TAE/g)의 함량을 보였고, 총 플라보노이드 함량은 제주(590.11 mg CE/g)가 외국산 홍



**Fig. 6.** Alleviation of increased expression of anti-oxidant proteins (A) on LPS-induced RAW 264.7 cells, following treatment with black tea extracts. Values with different letters above the bars were significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Each value is mean  $\pm$  standard deviations ( $n = 3$ ).

차와 유사하게 높은 함량을 보였다. 테아닌 함량은 국내산 홍차인 하동(651.50 mg%)이 외국산 홍차보다 매우 높은 함량을 나타냈다. 또한, DPPH 라디칼 소거능 활성과 환원력은 25  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 보성 홍차에서 높은 활성을 보였다. 25  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 ABTS 라디칼 소거능 활성은 제주(63.89%), 보성(59.73%)과 하동(52.76%)에서 높은 라디칼 소거능을 나타냈다. 대식세포에서의 세포 보호 효과는 50-100  $\mu\text{g/mL}$  농도의 모든 홍차 추출물에서 높은 세포 생존율을 보였고 200  $\mu\text{g/mL}$  농도에서는 보성이 98.22% 가장 높은 세포 보호 효과를 보여주었다. 세포 내 NO 생성 억제 활성은 국내산 하동, 제주와 보성 홍차의 모든 농도에서 외국산보다 높은 NO 생성 저해능을 보였다. LPS에 의해 염증이 유발된 대식세포에서의 항산화 효과를 확인하여 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 보성 홍차 추출물에서 SOD-1 발현이 LPS 단독 처리군에 비해 1.39배 증가하였다. 또한, GST 발현은 LPS 단독 처리군에 비해 보성과 제주 홍차 추출물에서 각각 1.52배와 1.46배 증가되었다. 본 연구에서는 국내산 홍차와 외국산 홍차를 비교 평가한 결과 보성과 제주 홍차 추출물의 항산화 단백질 발현은 폴리페놀이나 플라보노이드 성분과 밀접하게 관여한 것으로 보이며 하동 홍차의 NO 생성 억제 활성은 높은 테아닌 함량에 의한 것으로 판단된다. 본 연구에서 국내산 홍차 추출물인 보성, 제주와 하동 홍차가 항산화 및 항염증 활성이 있는 것으로 보이며 이는 기능성 소재로서의 개발의 가능성이 있다고 보인다.

### 감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획

지원의 농생명산업기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음(과제 번호: 319104-04-1-HD030)

### References

Ban EJ, Kim JH, Oh GY, Lee SY, Moon JH, Cho JY. Comparison of the antioxidative activities and bioactive compound contents of green tea, roasted green tea, and black tea. *J. Kor. Tea Soc.* 24: 64-71 (2018)

Bae MJ, Kim EN, Choi HK, B MS, Chung KH, Yoon JA, An JH. Quality characteristics and antioxidant activities of strawberries according to various extraction methods. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 07: 728-738 (2019)

Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200 (1958)

Cho YJ, Ahn BJ. Anti-inflammatory effect of extracts from cheongmoknosang (*morus alba* L.) in lipopolysaccharide stimulated raw cells. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 51: 44-48. (2008)

Cho EJ, Hwang CH, Yang MO. Changes in free amino acids and sensory evaluation of fermented tea (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) according to the degree of fermentation. *J. East Asian Soc. Dietary Life.* 17: 911-918 (2007a)

Cho JY, Moon JH, Park KH, Ma SJ. Aroma of fermented tea (I): mechanisms of aroma formations on black tea and oolong tea. *Korean J. Food Sci. Technol.* 40: 59-65 (2007b)

Choi OJ, Choi KH. The physicochemical properties of Korean wild teas (green tea, semi-fermented tea, and black tea) according to degree of fermentation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 356-362 (2003)

Choi YJ, Park MH, Kim YS, Jung KI. Antioxidant and anti-inflammatory effects of abies holophylla leaf extract in LPS-induced raw 264.7 cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 49: 569-577



- (2020)
- Duval B, Shetty K, Thomas WH. Phenolic compounds and anti-oxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *J. Appl. Phycol.* 11: 559-566 (1999)
- Fridovich, I. The biology of oxygen radicals. *Science.* 201: 875-880 (1978)
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45: 51-88 (2005)
- Jeon JR, Kim JY, Lee KM, Cho DH. Anti-obese effects of mixture contained pine needle, black tea and green tea extracts. *Applied Biological Chemistry.* 48: 375-381 (2005)
- Jeon SM, Lee JY, Kim HW, Lee YM, Jang HH, Hwang KA, et al. Antioxidant activity of extracts and fractions from aster scaber. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 9: 1197-1204. (2012)
- Jeong CH, Kang ST, Joo OS, Lee SC, Shin YH, Shim KH, et al. Phenolic content, antioxidant effect and acetylcholinesterase inhibitory activity of Korean commercial green, puer oolong, and black teas. *Korean J. Food Preserv.* 16: 230-237 (2009)
- Jeong HR, Kwak JH, Kim JH, Choi GN, Jeong CH, Heo HJ. Antioxidant and neuronal cell protective effects of an extract of *Houttynia cordata* Thunb (a Culinary Herb). *Korean J. Food Preserv.* 17: 720-726 (2010)
- Kang KO. Physiological and antioxidant activities of green, oolong and black tea extracts. *J. East Asian Soc. Dietary Life.* 21: 243-249 (2011)
- Kang WH, Lim JD, Li CH, Yu CY. Pathogene resistance of cotton GST cDNA in transgenic *Scrophularia buergeriana* Misrule. *Korean J. Plant Tissue Culture.* 28: 297-304 (2001)
- Kim KC, Kim JS. Phenolic content and antioxidant activity of sweet wormwood tea extracts using different solvents. *J. Plant Biotechnol.* 46: 338-345 (2019)
- Kim SH, Lee MH, Jeong YJ. Current trends and development substitute tea and plan in the korean green tea industry. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 19: 20-25 (2014)
- Kim JD, Lee SY, Kim SW. Modulation of hepatic lipid peroxidation and antioxidant defenses by wild plants extracts. *Kor. J. Pharmacogn.* 28: 48-53 (1997)
- Kim SN, Lee CM, Kim YC. Comparison in antioxidant activities of water extracts of green tea, white tea and black tea. *J. Invest. Cosmetol.* 8: 165-169 (2012)
- Kim KH, Ma JY, Kim SH. Comparison of free amino acid contents and the antioxidant activities of green tea, black tea and GABA black tea in gimhae areas. *J. Kor. Tea Soc.* 25: 49-57 (2019)
- Kim YC, Park EY, Kim SN, Yoo YG, Park MS, Lee GY, et al. Inhibitory effects of nude pack containing black tea water extract on skin wrinkle formation in hairless mice. *Korean J. Microscopy.* 41: 129-137 (2011)
- Koh JB. Effect of tea fungus/kombucha beverage on serum and liver lipids metabolism in rats. *J. Nutr. Health.* 33: 497-501 (2000)
- Lee BH, Jeon SH, Jeong H, Choi J, Kim YM, Yang KY, Nam SH. Functional characterization of domestic and foreign green tea cultivars at different harvest periods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 52: 427-434 (2020)
- Lee DS, Kim KH, Yook HS. Antioxidant effects of fractional extracts from strawberry (*Fragaria ananassa* var. 'Seolhyang') leaves. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 47: 263-270 (2018)
- Limón-Pacheco J, Gonshebb ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research.* 674: 137-147 (2009)
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65: 55-63 (1983)
- Nakagawa M. The nature and the origin of polyphenols in hoji-cha (roasted green tea). *Agr. Biol. Chem.* 31: 1283-1287 (1967)
- Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* 44: 307-315 (1986)
- Park SB, Lee DS, Kang JY, Kim JM, Park SK, Kang JE, et al. Protective effect on neuronal cells of *Orostachys japonicus* A. Berger extract against reactive oxygen species-induced neuronal cytotoxicity and active compounds. *Korea J. Food Sci. Technol.* 49: 524-531 (2017)
- Rahman SU, Li Y, Huang Y, Zhu L, Feng S, Wu J, Wang X. Treatment of inflammatory bowel disease via green tea polyphenols: possible application and protective approaches. *Inflammopharmacology.* 26: 319-330 (2018)
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237 (1999)
- Rho KA, Kim GJ, Ji HA, Lim HS, Chung KH, Lee KJ, et al. Antitumor and free radical-scavenging activities of various extract fractions of fruits and leaves from *Prunus mume*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 44: 1137-1143 (2015)
- Ronzio RA. 97-naturally occurring antioxidants. e12, pp. 731-751. In: *Textbook of Natural Medicine* (Fifth Edition). Pizzorno JE, Murray MT. Churchill Livingstone. Laco House, Theobalds Road, London, England (2020)
- Ryu BH, Park JO, Kim HS, Lim BG. Activity of superoxider dismutase (SOD) by fermented soybean. *J. Life Sci.* 11: 574-581 (2001)
- Shim DB, Hwang JG, Kang EJ, Son YH, Kwon MJ, Song SH, Kim JC. Changes on matcha quality according to different shading types. *J. Kor. Tea Soc.* 25: 88-96 (2019)
- Shim DB, Park SK, Kang EJ, Cho KH, Son YH, Kwon MJ, Jeon SH, Song IK, Kim JC, Hwang J. Chemical and antioxidant characteristics of black tea (*Jaeksal*) prepared using korean tea (*Carmellia sinensis* L.) cultivars. *J. Kor. Tea Soc.* 24: 56-62 (2018)
- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158 (1965)
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 44-84 (2007)
- Wang D, Gao Q, Zhao G, Kan Z, Wang X, Wang H, Huang J, Wang T, Qian F, Ho CT, Wang Y. Protective effect and mechanism of theanine on lipopolysaccharide-induced inflammation and acute liver injury in mice. *J. Agric. Food Chem.* 66: 7674-7683 (2018)
- Yan Z, Zhong Y, Duan Y, Chen Q, Li F. Antioxidant mechanism of tea polyphenols and its impact on health benefits. *Animal Nutrition.* 6: 115-123 (2020)
- Yang JK, Kim JC, Lee JG, Jo JS. The Changes of chemical composition of green tea by picking periods. *J. Agric. Life Sci.* 46: 49-61 (2012)
- Yeo SG, Ahn CW, Kim IS, Park YB, Park YH, Kim SB. Antimicrobial effect of tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 24: 293-298 (1995)
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64: 555-559 (1999)