반발효차의 항산화와 항염증 효과

이유림^{1,2} · 문교하^{1,2} · 정강현² · 이권재³ · 심두보⁴ · 김종철⁴ · 안정희¹

¹KC대학교 식품영양학과, ²서울과학기술대학교 식품공학과

³대전대학교 H-LAC, ⁴(재)하동녹차연구소

Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Semi-Fermented Tea

Yu-Rim Lee^{1,2}, Gyo-Ha Moon^{1,2}, Kang-Hyun Chung², Kwon-Jai Lee³,
Doobo Shim⁴, Jong Cheol Kim⁴, and Jeung Hee An¹

¹Department of Food Science and Nutrition, KC University

²Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science & Technology

³Department of H-Lac, Daejeon University

⁴Institute of Hadong Green Tea

ABSTRACT This study investigated the antioxidant and anti-inflammatory effects of 7 semi-fermented tea from Korea and China. The DPPH and ABTS radical-scavenging activities, and reducing power gradually increased as the concentration increased in all the sample groups. In the DPPH radical-scavenging activity (IC₅₀), domestic oolong tea (Hadong) was 9.99 µg/mL, white tea was 10.44 µg/mL and Junshan Yinzen tea was 4.99 µg/mL. Junshan Yinzen tea showed the highest antioxidant effect among other extracts. In the evaluation of ABTS radical-scavenging activities, except Seogwihuang cha (Jeju) and Da Hong Pao tea, other samples showed a higher ABTS radical-scavenging effect compared to the ascorbic acid control group. White tea (Hadong) with a concentration of 100 µg/mL showed a significant nitric oxide (NO) inhibition activity compared to all the other samples by decreasing NO production to 46%. In the analysis of MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in SH-SY5Y cells, domestic white tea (Hadong), Da Hong Pao tea, and Junsan Yinchen tea at a concentration of 100 µg/mL showed results of 68.16%, 69.96%, and 69.14%, respectively. These results indicated 20% higher anti-inflammatory effects compared to the MPTP treatment group. Therefore, our results suggest that domestic semi-fermented tea has good antioxidant and anti-inflammatory effects and is expected to have high utility value as a functional food material.

Key words: semi-fermented tea, antioxidant effect, anti-inflammatory effect

서 론

차는 세계 음료 소비량의 두 번째를 차지하고 있으며, 각 차는 고유 맛과 향의 특징을 가지는데 최근의 소비 동향은 음료 개념의 한계를 뛰어넘어 건강 가치를 가지는 차로서 새로운 사회·문화적 조건으로 평가되고 있다(Pastoriza 등, 2017; Komes 등, 2010; Patel, 2005). 차는 이미 여러 연구들을 통해 그 안에 있는 성분들이 인체 건강에 효과가 있다고 알려졌고, 대표적으로 항산화 작용, 고혈압과 동맥경화 억제, 과산화지질 억제를 통한 노화 예방 및 해독작용 등

다양한 생리 활성이 있다고 보고되었다(Kang, 2011). 차는 발효 정도와 방법에 따라 성분, 색, 향기, 맛 및 약리 작용 등이 달라져 녹차(비발효차), 반발효차, 발효차로 구분하는데 특히, 발효차 중에서 10~65% 발효된 차를 반발효차(부분발효차), 80% 이상 발효된 차를 발효차(홍차)라고 한다(Choi 등, 2009). 차에 존재하는 주요 성분 중 하나인 카테킨은 발효 과정 중 테아플라빈(theaflavins)과 테아루비긴(thearubigins)으로 산화된다. 그중 테아플라빈은 찻잎의 밝기, 색상 등을 담당하며 테아루비긴은 차의 맛 중 떫음 정도와 차를 우린 물의 색상에 관여한다(Tang 등, 2018).

Received 1 July 2021; Revised 29 August 2021; Accepted 30 August 2021

Corresponding author: Jeung Hee An, Department of Food and Nutrition, KC University, 47, Kkachisan-ro 24-gil, Gangseo-gu, Seoul 07661, Korea, E-mail: anjhee@hanmail.net

Author information: Yu-Rim Lee (Student), Gyo-Ha Moon (Graduate Student), Kang-Hyun Chung (Professor), Kwon-Jai Lee (Professor), Jeung Hee An (Professor)

Copyright © 2021 by The Korean Society of Food Science and Nutrition. All rights Reserved.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

테아플라빈은 theaflavin, theaflavin-3-gallate, theaflavin-3,3-digallate로 구성되어 있으며 카테킨과 더불어 항암 효과, 항혈전, 혈압강하, 중금속 제거 작용, 항돌연변이, 혈소판 응집 억제 작용, 심장병 발생 억제 효과, 중치 예방 효과, 항산화 작용, 항당뇨, 중추신경 활성화, 항천식 활성화 등 여러 가지 생리 활성을 나타낸다고 보고하였다(Jeong 등, 2009). 국내 차의 소비 특성상 녹차와 홍차 등 특정 차와 관련한 연구가 많이 진행되고 있으나 녹차와 발효차(홍차) 사이에 있는 반발효차는 상대적으로 인지도가 낮은 편이기 때문에 관련 연구가 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 국내와 중국의 시판 중인 반발효차를 중점으로 국내 3종, 중국 4종 모두 7종의 차 추출물에 대한 항산화 활성 능력을 분석하기 위해 총 폴리페놀, 플라보노이드 및 탄닌 함량 측정하였고, DPPH, ABTS 라디칼 소거능, 환원력을 비교 분석하였다. 또한 RAW 264.7 세포와 SH-SY5Y 세포에서 차 추출물의 세포독성 평가를 하였고, RAW 264.7 세포에서는 nitric oxide(NO) 생성 억제능 비교, SH-SY5Y 세포에서는 신경세포 보호능을 시료별 비교 분석함으로써 반발효차의 항산화 능력 및 여러 효능과 특성을 분석하여 반발효차의 기능성 식품 소재로서의 개발 가능성을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

재료

반발효차인 백차, 청차, 서귀황차는 하동 녹차연구소(Ha-dong, Korea)에서 제공되었다. 발효정도에 따라 백차(약발효), 황차, 청차로 구분하였다. 백차는 약 10% 발효되었고, 생산 과정에서 덩거나 비비는 물리적인 힘을 가하는 유념 과정 없이 자연스럽게 건조한 약발효 차이며 막 돌아난 차순 또는 솜털로 덮인 어린 찻잎을 사용하여 제조되었다. 황차는 약 20~50% 발효된 차를 말하며 황차의 기본 제다 과정인 채엽-살청-유념-민황-건조-완성을 거쳐 제조되었다. 특히 민황은 황차의 품질을 형성하는 중요한 절차로서, 유념 과정을 거친 잎을 쌓아두고 방치하여 잎 내부의 온도에 의해 서서히 발효를 진행하였다. 청차는 약 10~70% 발효시킨 차로 청차의 기본 제다 과정인 채엽-위조-주청-살청-유념-건조-완성을 통해 제조되었다. 중국 대홍포, 동정오룡, 백호은침, 군산은침은 (주)SNP 인터네셔널(Gyeonggi, Korea)에서 제공받아 시료로 사용하였다.

반발효차 추출물 제조

반발효차 7종의 추출물은 70% 에탄올을 이용하여 수행하였다. 각 반발효차 잎을 믹서기에 갈아 파우더 형태로 만들고 30 g씩 70% 에탄올에 5배수(v/w)로 혼합하였다. 그다음 실온에서 24시간 진탕시켜 여과하였다. 여과한 추출물은 회전진공농축기(R-114, Buchi Co., Flawil, Switzerland)

를 사용하여 농축시킨 후 남은 용매를 동결건조하여 수율을 측정하였고, 시료는 냉동고(-70°C)에 보관하여 사용하였다.

총 폴리페놀, 플라보노이드, 탄닌 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Singleton과 Rossi(1965)에 보고된 Folin-Denis의 방법을 변형하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 gallic acid를 사용하였으며 추출물 100 g 당 mg gallic acid equivalent(GAE, dry basis)로 함량을 산출하였다. 총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등(1999)의 방법을 응용하여 510 nm에서 측정하였다. 표준곡선은 (+)-catechin hydrate(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 검량선을 작성하였고, 추출물의 총 플라보노이드 함량은 추출물 100 g 당 mg (+)-catechin hydrate(CE, dry basis)로 나타냈다. 총 탄닌 함량은 Duval 등(2000)의 방법으로 725 nm에서 흡광도를 측정하였으며 tannic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 표준물질로 하였다. 총 탄닌 함량은 mg tannic acid equivalent(TAE)/100 g으로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 소거능은 Blois(1958)의 연구 방법을 변형하여 측정하였다. 일정 농도로 희석된 시료에 0.2 mM DPPH solution(Sigma-Aldrich Co.)을 가하여 혼합 후 암소에서 30분간 반응한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능 결과 값은 추출물 첨가구와 무첨가구를 비교하여 백분율(%)로 나타내어 농도에 따른 DPPH 라디칼 소거능을 확인하였고, DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도를 IC₅₀로 표시하였다.

ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능은 Arnao 등(2001)과 Re 등(1999)의 방법을 변형하여 사용하였다. 7 mM ABTS^{•+} 용액에 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하여 암소에서 약 24시간 반응시킨 ABTS^{•+} solution을 시료와 혼합하여 암소에서 6분간 반응시켜 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과값은 추출물 첨가구와 대조군을 비교하여 라디칼의 소거 활성을 백분율(%)로 나타내었고, ABTS의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도를 IC₅₀로 표시하였다.

환원력 측정

환원력은 시료에 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 6.6)와 1% potassium ferricyanide를 각각 혼합하여 50°C에서 20분 동안 반응시킨 후 1% trichloroacetic acid(w/v)를 가하여 원심분리 하였고, 상층액에 증류수, 0.1% ferric chloride 용액을 넣어 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. L-Ascorbic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 대조군으로 사용하여 나타내었다.

세포배양

RAW 264.7 세포주와 SH-SY5Y 세포주는 한국세포주은행(KCLB, Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 분양받아 100 U/mL penicillin과 100 mg/mL streptomycin(Welgene, Gyeongsan, Korea), 10%의 fetal bovine serum(Hyclone, Logan, UT, USA)이 함유된 DMEM 배지(Welgene)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다.

세포독성 평가

RAW 264.7 세포와 SH-SY5Y 세포를 96-well plate에 5×10^4 cells/well로 분주하여 시료를 처리하고 24시간 배양한 후 각 well에 MTT 용액(5 mg/mL)을 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 그 후 배양액을 제거하고 생성된 formazan 결정을 DMSO에 용해시켜 ELISA reader(Biochrome Ltd., Holliston, MA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 측정된 흡광도는 생존하는 세포의 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 MTT가 formazan으로 전환된 양을 나타내며 생존하는 세포 수와 비례한다.

NO 생성 억제 효과 측정

Lipopolysaccharide(LPS) 처리된 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess reagent system을 이용하여 측정하였다(Wang 등, 2007). 시료를 10, 50, 100 µg/mL 농도별로 처리한 후 분리된 RAW 264.7 세포의 배양 상층액 100 µL에 50 µL의 N1 buffer(sulfanilamide in the reaction buffer, iNtRon Biotechnology, Seongnam, Korea)를 첨가한 후 10분간 상온에서 반응한 다음 N2 buffer(naphthylethylenediamine in the stabilizer buffer, iNtRon biotechnology)를 50 µL 넣고 10분간 상온에서 반응시켜 ELISA reader(Biochrome Ltd.)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

MPTP에 의해 신경 염증 유도된 SH-SY5Y 세포에서 항염증 효과 측정

신경독소 물질인 MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)를 처리한 SH-SY5Y 세포에서 반발효차 추출물의 세포 보호 효과를 알아보기 위해 분석하였다. SH-SY5Y 세포를 96-well plate에 5×10^4 cells/well로 분주하고, 37°C incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 2 mM의 MPTP가 포함된 배지로 바꾸어주고 4시간 동안 배양한 다음, 10, 50, 100 µg/mL 농도별 각 시료의 추출물을 첨가하여 37°C incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 상층액을 제거하고 각 well에 200 µL의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 microplate reader(Biochrome Ltd.)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

통계처리

본 연구에서 실험값에 대한 통계분석은 SPSS 18.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 분산분석(ANOVA)법을 실행하였으며, 실험군 간의 유의성은 Duncan's multiple range test로 $P < 0.05$ 수준에서 유의적 차이를 검증하였다. 모든 실험은 3회 반복하였고 평균±표준편차(mean±SD)로 제시하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 및 플라노이드 탄닌의 함량 및 수율

본 연구에서 측정한 국내산 청차(하동), 백차(하동), 서귀황차(제주), 중국 대홍포, 동정오룡, 백호은침, 군산은침에 대한 총 폴리페놀, 플라노이드, 탄닌의 함량의 함량은 Table 1에 나타내었다. 총 폴리페놀의 함량은 국내산 청차(하동) 541.10 mg GAE/g, 백차(하동) 504.10 mg GAE/g 그리고 서귀황차(제주) 355.77 mg GAE/g으로 하동의 청차가 국내산 중 가장 높은 함유량을 보였다. 중국의 4종 차 중에서는 군산은침이 594.77 mg GAE/g으로 전체 시료군 중 가장 높은 총 폴리페놀을 함유 하고 있는 것으로 분석되었다. Kang(2011)의 보고에 의하면 녹차, 오룡차 및 홍차 추출물에 함유된 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과 오룡차>

Table 1. Comparison of total polyphenol, flavonoid, tannin, and yield contents of various extract fraction of semi-fermented tea

Sample		Total polyphenol (mg GAE ¹⁾ /g)	Total flavonoid (mg CE ²⁾ /g)	Tannin (mg TAE ³⁾ /g)	Yield (%)
National	Area				
Korea	Oolong tea, Hadong	541.10±6.24 ^{b4)5)}	129.72±18.36 ^d	273.93±24.97 ^{bc}	11.45±0.43
	White tea, Hadong	504.10±5.57 ^c	186.39±6.74 ^c	281.29±4.44 ^b	8.01±0.42
	Seogwi huangcha, Jeju	335.77±12.86 ^e	99.72±27.50 ^{de}	186.00±9.20 ^d	2.20±0.11
China	Da Hong Pao	497.10±11.53 ^c	224.72±19.88 ^a	277.73±7.56 ^{bc}	5.11±0.32
	Dong ding Oolong	457.77±3.21 ^d	90.83±6.01 ^f	248.68±5.41 ^c	8.14±0.38
	Baihao Yinzen Tea	492.43±5.13 ^c	201.94±28.20 ^b	262.15±16.15 ^{bc}	9.94±0.42
	Junshan Yinzen	594.77±10.21 ^a	120.28±25.02 ^{ef}	353.27±28.85 ^a	9.87±0.41

¹⁾Total polyphenol content was expressed as mg/g gallic acid equivalent (GAE).

²⁾Total flavonoid content was expressed as mg/g catechin equivalent (CE).

³⁾Tannic acid content was expressed as mg/g tannic acid equivalent (TAE).

⁴⁾Each value is mean±standard deviations of triplicate determination (n=3).

⁵⁾Means with different superscript letters (a-f) in a column are significantly different ($P < 0.05$).

녹차> 홍차 순으로 반발효차인 오롱차가 가장 높은 총 폴리페놀을 함유한 것으로 보고하였다. Shon 등(2004)은 열수 추출한 발효차의 평균 폴리페놀 함량은 23.5~23.9 g/100 g으로 보고하였는데 본 연구에서 70% 에탄올 추출하여 분석한 반발효차 7종이 Shon 등(2004)이 보고한 결과보다 100 g당 10 g 이상의 높은 총 폴리페놀이 함유한 것으로 분석되었다. 이것은 추출 용매에 따른 함량 차이로 보여진다. 일반적으로 식물 추출물 제조 시 물과 에탄올이 혼합된 에탄올 수용액은 침투 용이성이 높아 본 연구의 70% 에탄올이 페놀성 화합물 추출에 유리한 것으로 보여진다(Won 등, 2015).

본 연구에서 차 추출물의 플라보노이드를 분석한 결과 국내산 반발효차의 청차(하동)는 129.72 mg CE/g, 백차(하동)는 186.39 mg CE/g, 서귀황차(제주)는 99.72 mg CE/g 이었고, 중국차 시료군에서 대홍포는 224.72 mg CE/g, 동정오룡은 90.83 mg CE/g, 백호은침은 201.94 mg CE/g, 군산은침은 120.28 mg CE/g으로 분석되었다. 전체 시료군 중 중국의 대홍포가 가장 높은 총 플라보노이드 함량을 나타내었고, 중국차 동정오룡이 가장 낮은 함량을 나타내었다. 국내산에서 백차(하동)는 서귀황차(제주)보다 총 플라보노이드 함량이 약 1.8배 이상 높은 것으로 나타났다. Kim 등(2001)은 녹차 99% 에탄올 추출물에서 플라보노이드 함량이 31 mg CE/g으로 보고하였다. 본 연구의 70% 에탄올로 추출한 반발효차에서 Kim 등(2001)의 녹차 에탄올 추출물보다 55~59 mg CE/g 이상 높은 플라보노이드의 함량 차이가 나타났다. 이 결과는 Kim과 Kim(2018)의 연구에서 99.5% 에탄올 추출보다 60~80% 에탄올 추출물에서 플라보노이드 함량이 더 높게 나타난 결과와 같은 경향을 보인다. 일반적으로 플라보노이드는 유리기에 수소 원자를 공여하여 생체 내에서 산화 스트레스에 의해 과잉으로 생성된 활성 산소 등의 자유라디칼의 생성을 억제시킴으로써 항산화 작용을 가지는 것으로 알려져 있다(Sakanka 등, 1989). 따라서 반발효차에서 항산화 작용이 일어나는 플라보노이드의 추출을 높이기 위해 99%의 에탄올을 사용하는 것보다 60~80%의 에탄올을 사용하여 추출해야 하는 것이 유리한 것으로 보인다.

로 보인다.

탄닌은 차 맛을 좌우하는 일부분으로 색 및 향에 깊이 관여하는 성분으로 지나치게 양이 많으면 감칠맛이 적고, 쓰고 떫은맛이 강해 풍미가 떨어지는 특성을 가졌으며, 한국산 녹차잎은 총 폴리페놀 중 탄닌의 함량이 10~15% 안팎인 것으로 보고되었다(Jo 등, 2011). 반면, 본 연구에서 분석한 총 폴리페놀 대비 탄닌의 함량이 국내산 반발효차 청차(하동)는 약 50.6%, 백차(하동)는 55.8%, 서귀황차(제주)는 54%로 평균 50% 안팎으로 분석되었으며, 중국차 시료군에서는 총 폴리페놀 대비 탄닌의 함량이 대홍포는 55.8%, 동정오룡은 54.3%, 백호은침은 53.2%, 군산은침은 59.3%으로 총 폴리페놀 대비 탄닌의 함량이 평균 56%으로 분석되었다. Jo 등(2011)에서 보고한 국내산 녹차잎의 탄닌 함량보다 본 연구의 반발효차 추출물이 약 5배 높은 탄닌의 함량을 보였다.

국내산 시료에서 하동 청차의 수율은 11.45%, 백차는 8.01%, 제주의 서귀황차는 2.2%였고, 중국차 시료에서 대홍포는 5.11%, 동정오룡은 8.14%, 백호은침은 9.94%, 군산은침은 9.87%로 측정되었다. 추출 수율에서 청차의 수율이 가장 높았으며 서귀황차가 가장 낮은 수율을 보여주었다.

DPPH 라디칼 소거능의 변화

DPPH는 폴리페놀 화합물들의 hydroxyl group은 자유 라디칼을 안정화 시킬 수 있는 페놀기를 가지며 항산화 물질의 전자공여능에 의하여 수소 혹은 전자를 받아 짙은 자색에서 노란색으로 변하는 정도에 따라 항산화능을 평가하며, 일반적으로 식물 추출물에 있는 페놀성 물질은 항산화 활성과 밀접하게 관련되어 있다(Rice-Evans 등, 1997). 본 연구에서 분석한 DPPH의 라디칼 소거능의 결과는 Fig. 1과 같다. 모든 반발효차 시료군에서 농도가 5~50 µg/mL로 증가함에 따라 항산화능이 점차 증가함을 보였으며, 특히 12.5 µg/mL 이상 농도에서 50% 이상의 DPPH 라디칼 소거능을 보였다. 또한, 본 연구에서 분석한 대조군 물질인 ascorbic acid의 IC₅₀ 값은 3.66 µg/mL였으며, 청차(하동) 추출물의 IC₅₀ 값은 9.99 µg/mL, 백차(하동)는 10.44 µg/mL, 서귀황

Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of various extract fraction of semi-fermented tea. Values with different letters above the bars show a significantly difference at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Each value is mean $\pm$ SD ($n=3$).

차(제주)는 13.2 µg/mL로 국내산에서는 하동의 청차와 백차가 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보였다. 중국차 반발효차의 IC₅₀ 값은 대홍포가 9.3 µg/mL, 동정오룡이 16.16 µg/mL, 백호은침이 12.11 µg/mL, 군산은침이 4.99 µg/mL로 군산은침이 가장 높은 DPPH의 라디칼 소거능을 보였다. Park 등(2015)에 따르면 DPPH 라디칼 소거능은 총 폴리페놀, 플라보노이드 및 탄닌 함량과 연관성이 있다고 보고하였다. 본 연구에서도 앞서 언급한 총 폴리페놀, 플라보노이드 및 탄닌에서 함량이 높았던 하동의 청차, 백차 그리고 중국의 군산은침이 DPPH 라디칼 소거능 IC₅₀ 값 분석에서도 높은 항산화능을 보여 Park 등(2015)이 보고한 결과와 일치하는 것으로 보여진다. 또한, Kang(2011)에 의하면 녹차, 오룡차, 홍차의 DPPH 측정 결과에서 발효됨에 따라 항산화능이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에서도 발효 정도가 약한 백차에서 높은 항산화능을 보였다.

ABTS 라디칼 소거능의 변화

ABTS 라디칼 소거능은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS^{•+} cation 자유라디칼이 항산화력을 지닌 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색으로 탈색되는 것을 상대적으로 측정할 수 있으며, 이는 hydrogen donating antioxidants와 chain breaking antioxidants 모두를 측정할 수 있고 표준물질의 사용으로 추출물 간 상대 비교가 가능하다(Yoo 등, 2007). 또한 Dawidowicz 등(2013)은 두 기질과 반응물과의 결합 정도에 따라서 라디칼 제거에 대한 활성 능력에 차이를 가진다고 보고하였다. 본 연구의 ABTS 라디칼 소거 활성의 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 본 연구에서 분석한 대조군 물질인 ascorbic acid의 IC₅₀ 값은 6.06 µg/mL였으며, 청차(하동)의 IC₅₀ 값은 2.21 µg/mL, 백차(하동)는 3.73 µg/mL, 서귀황차(제주)는 7.27 µg/mL로 국내산 시료 중 하동 청차와 백차 모두 대조군인 ascorbic acid 보다 높은 항산화 활성을 보였다. 중국의 반발효차의 IC₅₀ 값은 대홍포가 7.34 µg/mL, 동정오룡이 4.82 µg/mL, 백호은침이 4.71 µg/mL, 군산은침이 4.38 µg/mL을 나타내었다. 본 연구의 ABTS 라디칼 소거 활성 분석에서

추출물의 IC₅₀ 값이 서귀황차(제주), 중국의 대홍포를 제외한 모든 시료군에서 대조군인 ascorbic acid보다 모두 높은 ABTS 라디칼 소거능으로 분석되었다. DPPH 라디칼 소거능과 같은 농도로 분석을 진행하였으나 ABTS 라디칼 소거능에서 추출 시료와 대조군 모두 더 낮은 농도인 2 µg/mL부터 약 30%의 항산화 활성을 보였으며, 25 µg/mL 농도에서는 하동의 백차와 중국의 동정오룡, 군산은침 그리고 대조군 ascorbic acid를 제외한 모든 시료군에서 더 이상 항산화능이 증가하지 않고 감소하는 추세를 보였다. 이는 Choi 등(2003)이 보고한 ABTS^{•+} 라디칼 소거능 방법이 수용상과 유기상 모두에 적용이 가능하기 때문에 DPPH 라디칼 소거능보다 시료의 항산화능을 나타내는데 더 민감하게 반응한 것으로 보여진다. 항산화 활성은 폴리페놀 함량 및 플라보노이드의 상관관계가 있다고 알려져 있으므로(Bae 등, 2019) 본 연구에서도 ABTS 라디칼 소거능은 폴리페놀과 플라보노이드가 관련이 있는 것으로 보인다.

반발효차의 환원력

본 연구에서 분석한 국내산과 중국의 반발효차 환원력 측정값은 Fig. 3과 같다. 모든 반발효차 시료군에서 추출물의 농도가 5~50 µg/mL로 증가할수록 유의적으로 환원력이 증가함을 보였다. 농도 5 µg/mL와 12.5 µg/mL에서는 7종의 시료군과 대조군인 ascorbic acid가 시료 간의 유의적 차이를 보이지 않아 항산화능을 가지는 것으로 나타났다. 농도 25 µg/mL에서는 국내산 하동 청차, 백차, 서귀황차는 각각 1.08, 0.92, 0.63으로 분석되었고, 중국차 시료군에서 대홍포, 동정오룡, 백호은침, 군산은침은 각각 0.88, 0.96, 0.88, 1.18로 분석되었다. 대조군인 ascorbic acid는 0.9로 하동의 청차와 백차, 중국의 대홍포와 군산은침이 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 농도 50 µg/mL에서는 국내산에서 하동의 청차와 백차, 제주 서귀황차의 환원력은 각 1.25, 1.22, 0.83이었고, 중국의 대홍포, 동정오룡, 백호은침, 군산은침은 각 1.1, 1.25, 1.27, 1.28로 분석되었다. 제주 서귀황차를 제외한 모든 시료군이 농도 50 µg/mL에서 대조군 ascorbic acid의 환원력 1.14보다 높은 환원력을 보

Fig. 2. ABTS radical scavenging activity of various extract fraction of semi-fermented tea. Values with different letters above the bars show a significantly difference at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Each value is mean $\pm$ SD ($n=3$).

Fig. 3. Reducing power of various extract fraction of semi-fermented tea. Values with different letters above the bars show a significantly difference at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Each value is mean $\pm$ SD ($n=3$).

였고, 제주 서귀황차의 환원력은 0.83으로 모든 시료군 중 가장 낮은 환원력을 보였다. Hassas-Roudsari 등(2009)에 따르면 여러 가지 기작 중에는 활성 산소 및 유리기에 전자를 공여함으로써 안정화시키는 작용이 있는데 넓은 범위에서 환원에 해당하고 환원력은 potassium ferricyanide reduction method를 사용한 화합물의 환원력을 평가하며, 흡광도 수치는 시료의 환원력을 나타내고 일반적으로 reduction의 존재와 연관이 있는 것으로 보고되고 있다. Kim 등(2013)은 환원력과 DPPH 라디칼 소거능은 매우 유사한 상관관계를 가진다고 보고하였는데 본 연구에서도 DPPH 라

디칼 소거능 IC_{50} 값에서 높은 활성을 보였던 하동의 청차와 백차, 중국차 군산은침이 환원력 50 µg/mL의 농도에서도 대조군인 ascorbic acid와 유의적인 차이를 보이지 않고 높은 항산화능을 보여 Kim 등(2013)과 같은 결과를 보였다. 이와 같이 반발효차는 라디칼 소거능이 매우 우수하기 때문에 항산화 기능성 소재의 연구가 요구된다.

대식세포와 신경세포에서의 세포독성 평가

대식세포와 신경세포에서의 세포독성 평가는 Fig. 4에 나타내었다. 반발효차 추출물의 처리가 세포독성에 미치는 영

Fig. 4. Cell viability of various extract fraction of semi-fermented tea in Raw 264.7 cell (A) and SH-SY5Y cell (B). Values with different letters above the bars show a significantly difference at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Each value is mean $\pm$ SD ($n=3$).

항을 평가하기 위하여 RAW 264.7 세포에서 농도별 추출물을 처리하여 반발효차에 대한 세포 생존율을 MTT 방법을 통하여 평가하였다. 시료의 추출물을 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 처리하였을 때, 모든 농도에서 세포독성이 보이지 않았다.

SH-SY5Y 신경세포에서 시료의 농도별 추출물을 처리하여 세포독성에 미치는 영향에 대해 MTT 방법을 통하여 평가하였다. 시료를 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 처리하였을 때, 국내산 처리군 모두에서 세포 생존율이 95% 이상으로 세포독성이 보이지 않았지만, 중국의 동정오룡은 100 µg/mL에서 세포생존율이 90%로 약간의 세포독성이 보여졌다.

LPS 유도된 대식세포에서의 NO 생성 억제 효과

본 연구에서는 LPS로 NO(nitric oxide) 생성을 유도한 RAW 264.7 대식세포에 국내와 중국의 반발효차의 시료를 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 비교하여 Fig. 5에 나타내었다. 대조군은 47%의 NO 생성능을 보였고, LPS 단독군은 100%의 NO 생성능을 보였다. LPS 처리 후 농도별로 반발효차 추출 처리군에서 LPS 단독군보다 NO 생성능이 감소하는 경향을 보였다. 국내산 시료인 하동의 청차와 백차, 제주의 서귀황차는 시료 농도 100 µg/mL에서 NO생성능이 각 63%, 46%, 56%였고, 중국차 대홍포, 동정오룡, 백호은침, 군산은침은 각 55%, 87%, 63%, 66%로 나타났다. 그중, 국내산 하동의 백차가 100 µg/mL에서 NO 생성량이 46%로 전체 시료 중 가장 높은 NO 생성 저해 활성을 보였다. 반면, 중국차 동정오룡은 100 µg/mL에서 NO 생성량이 86%으로 가장 낮은 NO 생성 저해 활성을 보였다. 농도 10~50 µg/mL에서는 국내산 시료 3종과 중국차 대홍포가 평균 64~68% NO 생성능을 보여주었으나 농도 간의 유의적 차이는 보이지 않았다. 반면, 중국차 동정오룡은 10~50 µg/mL에서 NO 생성 저해 활성이 보이지 않았다. NO는 L-arginine이 NOS에 의해 산화되어 생성되고 citrulline도 함께 생성되어 nitric oxide synthase(NOS)는 NOS-I(neuronal NOS, nNOS), NOS- II(inducible NOS, iNOS), NOS-III(endo-

thelialNOS, eNOS) 3종류로 나뉜다. Yim(2010)에 따르면 nNOS와 eNOS는 일반적으로 항상 발현되어 있어서 constitutive NOS(cNOS)라 하며, iNOS는 특정 자극이 있어야만 전사되어 발현되므로 inducible NOS(iNOS)라 한다. 특히 Kroncke 등(1998)의 보고에 따르면 iNOS의 전사를 유도하는 ligand로 IFN γ , TNF α , IL-1, LPS, CpG motif 등으로 알려져 있다. 또한 Nathan(1997)은 iNOS에서 생성된 NO가 주로 면역 반응 조절 및 세포독성에 관여하며 대식세포, 간세포, 파골세포, 수지상세포, 성상세포, 상피세포 등에 발현될 수 있다고 보고하였다. Jhoo(2008)는 발효차의 추출된 페놀성 화합물인 gallic acid가 발효 중에 형성되는 puerogallin 유도체(PCA)를 이용하여 LPS 유도된 RAW 264.7 세포에서 NO의 형성을 억제한다고 보고하였다. 본 연구에서 유의적인 NO 생성 저해 활성을 보인 국내산 하동의 백차는 총 플라보노이드 함량이 186 mg CE/g으로 총 페놀 대비 시료 중 가장 높은 총 플라보노이드 함량을 보였는데, Jhoo(2008)의 결과를 미루어 보아 시료의 총 플라보노이드 함량과 NO 생성 능력이 연관성이 있는 것으로 보여진다.

MPTP에 의해 신경 염증이 유도된 SH-SY5Y 세포에서 시료의 항염증 효과

신경독소 물질인 MPTP에 의해 신경 염증이 유도된 SH-SY5Y 세포에서 반발효차 추출물의 항염증 효능을 평가하기 위해 10, 50, 100 µg/mL로 각 시료 추출물을 처리하였다. 그 후 24시간 지나 MTT assay를 통해 세포 생존율로 추정된 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 반발효차 추출물의 첨가량이 증가함에 따라 항염증 효과가 유의적으로 증가하였다. 단독 MPTP를 2 mM로 처리했던 군에서는 세포 생존율이 49%였으며, 100 µg/mL 농도에서 국내산 하동의 청차와 백차, 제주의 서귀황차는 각 52%, 73%, 58%였고, 중국차 대홍포, 동정오룡, 백호은침, 군산은침은 각 69%, 53%, 64%, 69%의 세포 생존율을 보였다. 이 중 국내산 하동의 백차가 단독 MPTP 처리군에 비해 25%가 증가된 세포 생존율로

Fig. 5. Inhibitory effected of semi-fermented tea extracts on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages cells. Values with different letters above the bars show a significantly difference at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Each value is mean $\pm$ SD (n=3).

Fig. 6. SH-SY5Y cells (5×10^4 cells/mL) were incubated in the absence or presence of MPTP for 24 h. SH-SY5Y cells were treated with 2 mM MPTP and then incubated with various extract fraction of semi-fermented tea for 24 h. Subsequently, the survival rate was measured with a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. Values with different letters above the bars show a significantly difference at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Each value is mean $\pm$ SD ($n=3$).

가장 높은 항염증 효과를 보여주었다. 중국차 대홍포, 백호은침, 군산은침은 MPTP 단독 처리군에 비해 약 16~21%의 증가된 세포 생존율을 보여주었다. 시료 농도 50 µg/mL에서는 하동 백차와 중국 대홍포만이 세포 보호 효과를 가지는 것으로 나타났다. 시료 농도 10 µg/mL에서는 모든 시료군이 세포 보호 효과가 나타나지 않고, MPTP 단독 처리군과 비교하여 세포 생존율이 통계적으로 차이를 보이지 않았는데 이것은 시료의 농도가 너무 낮아 신경 염증이 유발된 세포에 보호 효과가 나타나지 않은 것으로 보여진다. 전체 시료 중에서는 국내산 하동의 백차가 가장 높은 항염증 효과를 나타내었다. Pyun(2009)에 따르면 탄닌 성분은 카테킨의 함량에 의해 epigallocatechin-3-gallate(EGCG), epigallocatechin(EGC), epicatechingallate(EGCg), epicatechin(EC), catechin으로 나뉘는데 그중 EC가 신경세포의 사멸을 보호한다고 보고하였다. 본 연구에서 MPTP 유도된 SH-SY5Y 세포에서 국내산 하동 백차와 중국차 대홍포 및 군산은침이 신경 보호 효과가 유의적 차이를 보이는 이유는 시료의 함유된 탄닌의 함량과 관련성이 있는 것으로 보여진다.

요 약

본 연구는 국내와 중국의 반발효차만을 중점으로 국내 3종, 중국 4종 모두 7종의 차 추출물을 시료별 항산화 능력 및 항염증 효능을 비교 분석하였다. 플라보노이드는 국내산 하동 백차가 186.39 mg CE/g으로 국내에서 가장 높은 함량을 보였으며, 중국차 시료에서는 대홍포가 224.72 mg CE/g로 높은 함량을 보였다. 총 폴리페놀 대비 탄닌의 비율은 국내산 하동 청차 50.6%, 백차 55.8%, 제주 서귀항차는 55.3%였고 중국차 대홍포는 55.8%, 동정오룡은 54.3%, 백호은침은 53.2%, 군산은침은 59.3%로 모든 시료군에서 전체 폴리페놀 대비 높은 탄닌의 함량을 보였다. DPPH와 ABTS 라디칼 소거능에서는 모든 시료군에서 농도가 증가함에 따라 항산화능이 증가함을 보였다. 청차(하동) 추출물의 IC₅₀ 값은 9.99 µg/mL, 백차(하동)는 10.44 µg/mL였고, 중국차 군산

은침이 4.99 µg/mL로 전체 시료 중에서 가장 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보였다. ABTS 라디칼 소거능은 국내 서귀항차(제주), 중국차 대홍포를 제외한 모든 시료군에서 대조군인 ascorbic acid보다 모두 높은 ABTS 라디칼 소거능을 보였다. 환원력에서는 시료의 농도가 증가됨에 따라 환원력이 증가하였고, 환원력과 DPPH 라디칼 소거능 모두 시료의 항산화능과 상관관계를 가지는 것으로 분석된다. LPS로 NO 생성을 유도한 RAW 264.7 대식세포에서 국내산 하동의 백차가 100 µg/mL에서 NO 생성량이 46%로 NO 생성능이 감소하여 전체 시료 중 가장 유의적인 NO 생성 저해 활성을 보였다. 신경독소 물질인 MPTP에 의해 신경 염증이 유도된 SH-SY5Y 세포에서 단독 MPTP를 2 mM로 처리했던 군의 세포 생존율이 49%였으며, 시료 중 국내산 하동의 백차와 중국차 대홍포, 군산은침이 100 µg/mL 농도에서 각 68.16%, 69.96%, 69.14%의 결과를 보여 MPTP 단독 처리군에 비해 20% 높은 항염증 효능을 나타내었다. 본 연구의 결과를 통해 국내산과 중국의 반발효차의 항산화 및 항염증의 효능을 확인하여 기능성 식품 소재로서의 높은 활용 가치를 가질 것으로 보인다.

감사의 글

이 논문은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 농업생명산업기술개발 프로그램의 지원을 받아 연구되었습니다(과제번호: 319104-04-1-HD030).

REFERENCES

- Arnao MB, Cano A, Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.* 2001; 73:239-244.
- Bae MJ, Kim EN, Choi HK, Byun MS, Chung KH, Yoon JA, et al. Quality characteristics and antioxidant activities of strawberries according to various extraction methods. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2019; 48:728-738.
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free

- radical. *Nature*. 1958. 181:1199-1200.
- Choi Y, Han SK, Moon JH, Kim S, Ma SJ, Cho JY, et al. Characterization of the maximum fermented point in enzymatic fermentation of tea. *J Kor Tea Soc*. 2009. 15:85-91.
- Choi Y, Kim M, Shin JJ, Park JM, Lee J. The antioxidant activities of the some commercial teas. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2003. 32:723-727.
- Dawidowicz AL, Olszowy M. The importance of solvent type in estimating antioxidant properties of phenolic compounds by ABTS assay. *Eur Food Res Technol*. 2013. 236:1099-1105.
- Duval B, Shetty K, Thomas WH. Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *J Appl Phycol*. 2000. 11:559-566.
- Hassas-Roudsari M, Chang P, Pegg R, Tyler R. Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanol and hot water extraction. *Food Chem*. 2009. 114:717-726.
- Jeong CH, Kang ST, Joo OS, Lee SC, Shin YH, KH S, et al. Phenolic content, antioxidant effect and acetylcholinesterase inhibitory activity of Korean commercial green, puer, oolong, and black teas. *Korean J Food Preserv*. 2009. 16:230-237.
- Jhoo JW. Anti-inflammatory effects of purpurogallin carboxylic acid, an oxidation product of gallic acid in fermented tea. *Korean J Food Sci Technol*. 2008. 40:707-711.
- Jo JS, Kim JC, Cho KH, Kim R, Han JY. Chemical constituent variabilities of the green tea leaves by harvest periods. *J Korean Wood Sci Technol*. 2011. 39:370-380.
- Kang KO. Physiological and antioxidant activities of green, oolong and black tea extracts. *J East Asian Soc Diet Life*. 2011. 21:243-249.
- Kim H, Kim MS, Kim SH, Yun KW, Song JH. Analysis of total phenolic content and antioxidant activity from fruits of *Vaccinium oldhamii* Miq.. *J Korean For Soc Sci*. 2013. 102: 566-570.
- Kim KC, Kim JS. Effect of ethanol solvent concentration on antioxidant activity of Dolwoe (*Gynostemma pentaphyllum* Makino) leaves extracts. *J Adv Eng Tech*. 2018. 11:197-203.
- Kim SK, Lee HJ, Kim MK. Effect of water and ethanol extracts of persimmon leaf and green tea different conditions on lipid metabolism and antioxidative capacity in 12-month-old rats. *Korean J Food & Nutr*. 2001. 34:499-512.
- Komes D, Horžić D, Belščak A, Ganić KK, Vulić I. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. *Food Res Int*. 2010. 43:167-176.
- Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol*. 1998. 113: 147-156.
- Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: What difference does it make?. *J Clin Invest*. 1997. 100:2417-2423.
- Park JH, Bae NY, Park SH, Kim MJ, Kim KBWR, Choi JS, et al. Antioxidant effect of *Sargassum coreanum* root and stem extracts. *KSBB J*. 2015. 30:155-160.
- Pastoriza S, Mesías M, Cabrera C, Rufián-Henares JA. Healthy properties of green and white teas. *Food Funct*. 2017. 8:2650-2662.
- Patel SH. *Camellia sinensis*: historical perspectives and future prospects. *J Agromedicine*. 2005. 10:57-64.
- Pyun J. Protection effect of EC on radiation-induced cell death of auditory cell *in vitro* and *in vivo*. Dissertation. Ajou University, Suwon, Korea. 2009.
- 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*. 1999. 26:1231-1237.
- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*. 1997. 2:152-159.
- Sakanka S, Kim M, Taniguchi M, Yamamoto T, Yamamoto M. Antibacterial substance in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*. a cariogenic bacterium. *Agric Biol Chem*. 1989. 53:2307-2311.
- Shon MY, Kim SH, Nam SH, Park SK, Sung NJ. Antioxidant activity of Korean green and fermented tea extracts. *J Life Sci*. 2004. 14:920-924.
- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965. 16:144-158.
- Tang P, Shen DY, Xu YQ, Zhang XC, Shi J, Yin JF. Effect of fermentation conditions and plucking standards of tea leaves on the chemical components and sensory quality of fermented juice. *J Chem*. 2018. Article ID 4312875. <https://doi.org/10.1155/2018/4312875>
- Wang S, Chen Y, He DD, He L, Yang YM, Chen J, et al. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by serum from rats treated orally with *Gastrodia* and *Uncaria* decoction, a traditional Chinese formulation. *J Ethnopharmacol*. 2007. 114:458-462.
- Won BY, Shin KY, Ha HJ, Yun YS, Kim YR, Lee HG. Changes in nutritional composition of dropwort (*Oenanthe javanica*) ethanol extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2015. 44:882-887.
- Yim CY. Nitric oxide and cancer. *Korean J Med*. 2010. 78:430-436.
- Yoo KM, Kim DO, Lee CY. Evaluation of different methods of antioxidant measurement. *Food Sci Biotechnol*. 2007. 16:177-182.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*. 1999. 64:555-559.