

채취시기가 다른 국내외 녹차잎의 기능성분 함량, 뇌세포 생존 및 대사 효소 활성 조절 효과 조사

이방희¹ · 전세현² · 정하나³ · 최 정⁴ · 김영민² · 양광열¹ · 남승희^{2,3,*}

¹전남대학교 응용생물학과, ²전남대학교 식품공학과,
³전남대학교 농업과학기술연구소, ⁴전남농업기술원 차산업연구소

Functional characterization of domestic and foreign green tea cultivars at different harvest periods

Bang-Hee Lee¹, Sae Hyun Jeon², Hana Jeong³, Jung Choi⁴, Young-Min Kim², Kwang-Yeol Yang¹, and Seung-Hee Nam^{2,3,*}

¹Department of Applied Biology Graduate School, Chonnam National University

²Department of Food Science & Technology, Chonnam National University

³Institute of Agricultural Science and Technology, Chonnam National University

⁴Tea Industry Institute, Jeonnam Agricultural Research & Extension Services

Abstract This study was performed to compare nutritional compounds and physiological functions of five domestic and imported green tea cultivars at three time points. The five cultivars were compared for theanine, γ -aminobutyric acid, and catechin content by LC-MS/MS and HPLC. Furthermore, the five tea cultivars were functionally characterized with respect to antioxidant activity, brain cell protective effect, and inhibitions of α -glucosidase and HMG-CoA reductase activities. Among green tea cultivars, Chamnok had the highest content of catechins (198 mg/g DW), theanine (11.89 mg/g DW), and tannin (23.6 mg/g DW). Considering functional properties, Chamnok treatment resulted in the maximum viability of brain cells and reduced the cortisol content of SH-SY5Y cells. The inhibition of α -glucosidase and HMG-CoA reductase was the strongest following Chamnok treatment (72.9% and 69.8%, respectively). These results indicate that Chamnok could be optimal for consumption or favorable processing owing to its high nutritional compounds, such as theanine and catechin, and remarkable brain cell protective effects.

Keywords: Green tea, cultivar, theanine, catechin, function

서 론

녹차는 오랜 역사를 가진 비알콜성 기호음료로서 아시아를 비롯한 160여 개 나라에서 널리 음용되어 왔다(Byun 등, 2004). 녹차는 다양한 폴리페놀 성분을 함유하고 그 중 catechin은 (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) 등으로 존재하며 (Sung 등, 2016), 항 종양 및 면역 조절 등의 기능을 나타낸다 (Crespy V와 Williamson G 2004). 또한 테아닌은 녹차의 주요 아미노산중의 하나로서 뇌 알파파를 증가시켜 진정효과를 보이며, dopamine과 serotonin의 조절기능이 있음을 보였으며, 녹차추출물 함유 음료섭취 시 뇌파의 변화 및 그에 따른 불안증 개선 효과가 있음이 보고된 바 있다(Park 등, 2009). 또한 녹차에 존재하는

γ -aminobutyric acid(GABA)는 비단백질 구성아미노산으로서 사람에게 있어서는 신경계, 혈액에 함유되어 있고 이의 대부분은 뇌의 골수에 존재하여 Acetyl choline이라 불리우는 신경 전달 물질을 증가시키고, 뇌 기능을 촉진시키는 등의 생리활성을 하는 것으로 알려져 있다(Jang 등, 1992). 이렇듯 녹차는 기능성을 가진 성분을 다량 함유하고 있지만, 찻잎의 품종, 채취시기, 찻잎의 경화도 등 주위환경에 의해 크게 좌우된다. 대표적으로 테아닌은 봄에 채취하는 찻잎에 많고, 카테킨은 채취시기가 늦을수록 많이 존재한다고 알려져 있다(Yang 등, 2012; Wee 등, 1999).

한편 우리나라에서 주로 판매되고 소비되는 차는 녹차이며(Han 등, 2010), 그에 따라 녹차에 대한 다양한 연구가 진행되고 있다. 하지만 건강에 관한 관심이 높아지고 특히 최근 뇌 건강에 대한 관심이 높아지면서 같은 차 제품에서도 유용 성분이 다량 함유된 차 제품의 개발이 요구되고 있다. 현재 시중에서 사용되는 녹차는 야부기다 등 일본품종으로 일본에서 수입되어 사용 중으로 우리나라 고유 품종인 참녹, 보향 등을 개발해 우수성을 알리고 보급하고자 하는 노력이 지속 중이다. 이에 따라 국내 품종에 대한 녹차의 채취시기에 따른 유용 성분의 규명 및 생리활성 연구는 다양하게 이루어지고 있지만(Kang과 Shon, 2007; Kim 등, 2009; Yang 등, 2012). 국내품종과 외래 품종별 채취시기에 따른 성분 변화를 측정하여 항산화 활성 등 생리활성과 뇌 건강 기능

*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 July 22, 2020; revised August 30, 2020;
accepted August 31, 2020

에 대한 상관성을 파악하는 연구는 미흡한 실정이다.

이에 본 연구에서는 국내, 외래 녹차종을 원료로 채취 시기를 달리하여 유용 성분인 카테킨과 테아닌 함량을 비교, 분석하고 인체에 유익한 효능인 항산화효과, 다이어트와 관련된 α -glucosidase와 HMG-CoA reductase 저해능, 뇌신경세포 이용 뇌보호효과 분석을 통해 품종별 채취시기와 유용 성분과의 상관성을 파악하여 국내 육성된 녹차 품종의 우수성을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

본 시험에서 사용한 녹차(*Camellia sinensis* var. *sinensis*)는 10년생을 선별하여 5개 품종에서 3시기(봄차, 여름차, 가을차)에 수확, 실험하였다. 재래 (native) 및 국내 품종인 보향(Bohyang), 참녹(Chamnok) 그리고 외래 품종인 야부기다(Yabukita), 후순 (Fushun) 사용하였다. 시기별로 봄차는 2019년 4월 25일, 여름차는 2019년 6월 25일, 가을차는 2019년 9월 25일에 전라남도 보성의 전남농업기술원, 차산업연구소에서 직접 채취하여 정선 및 수세 작업을 거쳐 동결건조하여 분석용 시료로 사용하였다. 녹차의 유용성분 분석을 위한 표준품인 bovine serum albumin (BSA), gallic acid, 테아닌 (L-theanine), GABA (γ -aminobutyric acid), 카페인 (caffeine)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을, methanol, ethyl acetate, trifluoroacetic acid (TFA) 등 용매는 Alfa Aesar Co., Inc. (Seoul, Korea) 제품을 HPLC 용도로 사용하였다. 항산화능 측정용 시약으로 ABTS (2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)와 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 모든 분석 시약은 90% 이상 순도인 시약을 사용하였다.

추출물 제조

녹차의 유용 성분 함량 및 항산화 활성 측정을 위한 추출물은 건조하여 분쇄한 시료 1.5 g에 30 mL (5%, w/v) 100% 증류수 또는 80°C, 80% ethanol로 60°C에서 3시간 Soxhlet 추출한 후 두 추출물 모두 15분 초음파처리를 한 다음 0.22 μ m amphiphilic membrane filter (Futecs Co., Ltd, Daejeon, Korea)로 여과하여 분석용 시료로 사용하였다. HPLC 측정을 위한 추출물은 건조하여 분쇄한 시료 1 g을 0.1% TFA를 첨가한 증류수에 녹여 60°C에서 1시간 진탕 배양한 뒤 30분 초음파 처리한 후 10,000 rpm, 30분, 4°C 조건에서 원심 분리하고 0.22 μ m membrane filter로 여과하여 분석용 시료로 사용하였다. 기능성조사를 위해 녹차시료 50 μ g/mL 농도로, 다이어트효과는 80%에탄올 추출물을 뇌세포실험은 같은농도의 물추출물을 이용해 조사하였다.

Theanine, GABA 및 총아미노산 함량 측정(LC-MS/MS)

LC-MS/MS 분석에는 1200 series LC와 결합된 6410A triple quadrupole mass spectroscopy (Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였다. Positive electro-spray ionization (+ESI) 장치로 시료를 이온화 시킨 후 multiple reaction monitoring (MRM) mode에서 분석을 실시하였으며, nebulizer 압력, N₂ gas 유속 및 온도는 각각 40 psi, 10 L/min, 310°C로 설정하고 capillary voltage는 4 kV를 유지하였다. Column으로 Gemini-NX C18 (4.6×150 mm, 3 μ m, Phenomenex)을 사용하였으며, 시료 주입량은 5 μ L, column oven은 35°C를 유지하였다. 이동상으로 5 mM ammonium acetate와 0.1% formic acid가 혼합된 water (A)와 methanol (B)을 사용하여 초기 0% B에서 시작하여 95% B까지 순차적으로 변화시킨

후 다시 0% B로 낮춰서 30분간 분석을 실시하며, 유속은 0.5 mL/min으로 유지하였다. 표준품은 L-theanine을 사용하였다.

탄닌, 총페놀 및 플라보노이드 함량 측정

탄닌 함량은 Duval과 Shetty(2001)의 방법에 따라 물 추출물 50 μ L에 주석산철 시약 50 μ L을 넣고 교반 후 Sorensen's phosphate 완충액(pH 7.5)을 150 μ L 첨가한 뒤 또다시 교반한 후 실온에서 60분간 발색 시키고 microplate spectrophotometer (Synergy HTX, Biotek Epoch, Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 탄닌 함량은 ethylgallate (Sigma-Aldrich Co. St. Louise, MO, USA) 10 mg을 10 mL 증류수에 용해하여 동일한 방법으로 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다. 총페놀 함량은 Folin-Denis법을 일부 변형하여 methanol 추출물 시료 0.0625 mL에 1 N Folin-Denis reagent 0.0625 mL를 첨가하고 충분히 혼합한 다음 6분간 암실에서 반응시켰다. 그 후 7% Na₂CO₃ 0.0625 mL와 증류수 1.5 mL를 첨가하여 실온의 암소에서 60분간 반응시킨 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총페놀 함량은 gallic acid 10 mg을 methanol 10 mL에 용해한 표준용액을 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다. 플라보노이드 함량은 Abeysinghe 등(2007)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 96 well plate에 시료와 90% diethylene glycol을 넣고 3분 동안 microplate agitator (Synergy HTX, Biotek Epoch, Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 흔들어주었다. 2 N NaOH 용액을 각 well에 넣은 후 37°C에서 30분간 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 플라보노이드 함량은 quercetin 10 mg을 methanol 10 mL에 용해한 표준용액을 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

녹차의 카테킨 함량 측정(HPLC)

HPLC 분석에는 1216 Infinity LC (Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였다. Column으로 Eclipse plus C18 (4.6×250 mm, 3 μ m, Zorbax)을 사용하였으며, 시료 주입량은 10 μ L, column oven은 40°C를 유지하였다. 이동상으로 0.1% TFA와 증류수가 혼합된 water (A)와 0.1% TFA와 증류수가 혼합된 methanol (B)을 사용하여 초기 20% B에서 시작하여 70% B까지 순차적으로 변화시키면서 30분간 분석을 실시하며, 유속은 1.0 mL/min으로 유지하였다. 표준품 catechin (C), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin-3-gallate (ECg), epigallocatechin-3-gallate (EGCg)는 Sigma Chemical Co. (St. Louise, MO, USA) 제품을 사용하였다.

DPPH, ABTS radical 소거활성 측정

DPPH radical 소거활성은 Blois(1958)의 방법을 일부 변형하여 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)의 환원력을 이용하여 96-well microplate에 시료를 분주하여 측정하였다. 1 mM DPPH reagent 250 μ L와 methanol 추출물 50 μ L를 혼합, 37°C에서 10분 동안 반응시킨 후 microplate spectrophotometer (Synergy HTX, Biotek Epoch, Agilent, Santa Clara, CA, USA)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS와 2.5 mM potassium persulfate를 최종 농도로 혼합하여 radical 소거활성은 Re 등(1999)의 방법을 96 well plate에 맞게 수정하여 실시하였다. 7 mM ABTS 장실에서 12시간 이상 보관하여 ABTS⁺을 형성시킨 후 735 nm에서 흡광도 값이 0.90±0.15가 되게 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)으로 희석하였다. 이 ABTS⁺ 용액을 ethanol과 1:3 혼합한 후 plate

에 1.25 mL를 넣고 735 nm에서 흡광도를 측정하였다. 96 well plate에 희석 된 ABTS⁺ 용액 250 μ L와 물 추출물 50 μ L를 혼합하여 암소에서 30분 방치한 다음 microplate spectrophotometer를 이용하여 735 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준품으로 ascorbic acid를 사용하였으며 DPPH와 ABTS radical 소거활성은 추출물의 첨가 전과 후의 차이를 아래와 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{Radical scavenging activity}=(1A_{\text{test}}/A_{\text{control}})\times 100$$

α -Glucosidase 활성 억제 조사

최종 농도가 50 μ g/mL가 되도록 에탄올추출물 시료를 넣어주고, yeast baker 기원의 α -glucosidase (Sigma, St. Louis, MO, USA) 200 μ L, 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 1 mL를 24-well plate에 넣고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실온에서 10분간 배양한 후 5 mM p-nitrophenol glucoside 200 μ L를 가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 뒤, 동일한 파장에서 흡광도를 측정하였고, 흡광도의 변화로부터 효소저해활성을 계산하였다. 표준품은 acarbose (Sigma, St. Louis, MO, USA) 를 시료와 같은 농도로 제조하여 측정하였다.

HMG-CoA reductase 저해도 조사

콜레스테롤 합성 저해 활성은 HMG-CoA reductase assay kit (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 50 μ g/mL 에탄올추출물 추출물 시료로 in vitro에서 측정하였다. 간략하면, HMG-CoA reductase에 의해 HMG-CoA가 mevalonate로 환원될 때 NADPH가 NADP⁺로 산화되는 정도를 340 nm에서 15분간 흡광도의 변화로 측정하였다. Lovastatin을 positive control로 사용하여 시료의 저해 활성과 비교하였다. HMG-CoA reductase 활성 저해율(%)은 아래의 계산식과 같이 blank의 흡광도 변화(100% 활성)에 대한 시료의 흡광도 변화로 계산하였다.

$$\begin{aligned} & \text{활성 저해율(\%)} \\ & = (1 - \text{시료의 흡광도 변화} / \text{Blank의 흡광도 변화}) \times 100 \end{aligned}$$

세포독성 측정

세포독성은 MTT 시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 Mosmann (1983)의 방법을 변형하여 실시하였다. RAW 264.7세포를 5×10^4 cells/well 농도로 96-well plate에 분주한 후 시료를 0-100 μ g/ml의 농도가 되도록 세포배양매지로 희석하여 첨가하고 12시간 전처리 하였다. 그 후 lipopolysaccharide (*E. coli* serotype 055:B5)를 100 ng/ml로 세포에 첨가하여 24시간 동안 염증반응을 유도하였다. MTT 용액(5 μ g/mL)을 첨가하고 4시간 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 100 μ L acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)을 첨가한 후, 생성된 formazan이 용출 되도록 하여 microplate spectrophotometer (Synergy HTX, Biotek Epoch, Agilent, Santa Clara, CA, USA)로 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생존율은 대조군에 대한 흡광도의 차를 백분율로 표시하여 비교 분석하였다. 이때 사용된 녹차시료는 50 μ g/mL 물추출물을 이용하여 조사하였다.

뇌 신경세포 보호 효과 조사

뇌신경세포(SH-SY5Y) (neuroblastoma, human dopaminergic neuronal cell)에 1% antimicrobials/antibiotics와 10% FBS를 함유한 RPMI-1640 배지에서 배양하고 96-well plate에 세포수가 10^4 - 10^6 cell/mL가 되도록 seeding 한 후 24시간 지난 후에 봄차 녹차 시료를 품종별로 50 μ g/mL 처리하였다. 100 mM glutamate를 처리

해 스트레스가 유발된 세포를 MTT를 이용한 cell viability를 측정하였다. positive control로는 1-10 μ M theanine를 사용하였다. 그 후 570 nm 파장으로 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 통한 스트레스 보호 효과를 조사하였다.

항 스트레스 효과 조사

항스트레스 효과를 정량하기 위해 세포배양액 상등액을 10,000 \times g에서 10분간 원심 분리 후 사용하였다. 실험은 4°C에서 수행하였으며 항스트레스 효과는 Cortisol Elisa Kit (Calbiotech Inc., Los angeles, CA, USA)를 이용하였으며, cortisol MAb가 코팅된 microplate를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소는 뇌신경세포(SH-SY5Y) 배양액 1 mL에 균질화를 위한 buffer (1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 1% Triton X-100) 혼합액에 10 mM Tris-HCl (pH 7.2)를 5 mL 첨가후 glass-Col homogenizer로 균질화된 세포배양액을 10,000 \times g, 10분간 원심분리후 상등액을 효소실험에 사용하였다.

통계처리

모든 실험 결과들은 3회 반복 측정하여 평균값과 표준편차로 나타냈으며, 각 처리별 평균치간의 유의성 검정은 SAS 프로그램 (Package relwase 8.01)을 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였다. 평균간 유의적 차이가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

Theanine, GABA 및 총 아미노산 함량 측정

재래(native), 국내 품종인 보향(Bohyang), 참녹(Chamnok) 그리고 외래 품종인 야부기다(Yabukita), 후순(Fushun)을 시기별로 채취하여 원료로 하여 제조한 녹차의 테아닌, GABA 및 총 아미노산 함량을 측정하였다. 그 결과(Table 1), 테아닌과 GABA 함량은 모든 품종에서 채취 시기가 늦어질수록 함량이 감소하는 경향을 나타내었고, 이는 Kang and Shon 등(2007)에 의해 연구된 한국 재래종 녹차에 대한 성분조성에서 테아닌 함량은 채취시기가 늦을 수록 감소하는 경향을 보여 본 실험과 같은 경향을 나타내었다. 또한 Kang and Shon 등(2007)의 보고에서 4월 1-15일 사이에 채취한 봄차의 테아닌 함량이 14.11 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 4월 16-30에 채취한 찻잎의 테아닌은 10.36 mg/g로 측정되었다. 본 실험에서 비슷한 시기인 4월 25일 채취된 봄차에서 9.13 \pm 0.02-11.21 \pm 0.02 mg/g의 테아닌 함량을 보여 본 연구결과와 유사 하였다.

녹차에 함유된 GABA는 지속적으로 (α + θ)파를 증가시켜 단기 기억력 향상에 도움이 된다고 알려져 있어(Kim과 Yoon, 1998), GABA의 함량과 기억력 개선효과의 상관성을 파악하기 위해 시기별로 채취한 품종별 GABA함량을 측정하였다. 본 실험에서 GABA 또한 채취 시기가 늦어질수록 감소하는 경향을 나타내었고, 보성산 녹차 채취시기에 따른 화학성분을 비교한 Kim 등(2004)의 보고에서 GABA 함량은 4월 채취한 잎에서 0.49 \pm 0.22 mg/g으로 측정되었고, 그 후 점진적으로 감소하여 본 실험과 같은 경향을 보였다. 다만 본 실험에서 찻잎의 GABA 함량에 비해 Kim 등(2004)의 실험에서 더욱 높게 나타났는데, 이는 본 실험과 Kim 등(2004)의 시료 채취 후 가공의 차이 및 품종 차이에 의해 기인한 것으로 판단되며, GABA의 함량 변화는 재배 지역에 의한 차이 뿐 아니라 채취시기, 가공 방법에 의해 영향을 받는 것이 Han 등(2007)의 연구결과로 확인되었다. 또한 생엽을 헝기

Table 1. Theanine, GABA and total amino acids content in green tea extract by 3 different harvest periods and 5 different cultivars

Harvest ¹⁾ Periods		Theanine	GABA	Total amino acid
		(mg/g DW)		
Spring	<i>Native</i>	10.10±0.01 ^b	0.19±0.01 ^c	6.52±0.03 ^a
	<i>Fushun</i>	11.21±0.02 ^a	0.24±0.01 ^b	5.18±0.14 ^b
	<i>Yabukita</i>	9.13±0.02 ^c	0.34±0.01 ^a	4.90±0.02 ^c
	<i>Bohyang</i>	9.22±0.06 ^c	0.26±0.01 ^b	4.75±0.01 ^c
	<i>Chamnok</i>	9.29±0.11 ^c	0.26±0.02 ^b	5.26±0.01 ^b
Summer	<i>Native</i>	3.39±0.02 ^b	0.08±0.01 ^b	5.35±0.00 ^a
	<i>Fushun</i>	3.77±0.02 ^a	0.13±0.01 ^a	4.99±0.01 ^{ab}
	<i>Yabukita</i>	3.05±0.02 ^c	0.06±0.00 ^c	4.64±0.02 ^c
	<i>Bohyang</i>	3.11±0.00 ^d	0.07±0.01 ^c	4.90±0.01 ^c
	<i>Chamnok</i>	3.17±0.11 ^c	0.12±0.01 ^a	4.18±0.00 ^b
Autumn	<i>Native</i>	1.49±0.01 ^c	0.06±0.01 ^c	5.37±0.01 ^c
	<i>Fushun</i>	1.54±0.01 ^b	0.06±0.01 ^a	4.50±0.01 ^c
	<i>Yabukita</i>	1.87±0.03 ^c	0.05±0.01 ^a	5.63±0.01 ^a
	<i>Bohyang</i>	1.82±0.01 ^b	0.03±0.01 ^b	5.79±0.01 ^d
	<i>Chamnok</i>	1.89±0.01 ^a	0.06±0.00 ^a	5.48±0.00 ^b

All values are Mean±SD (n=3) within each column followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

^{a-c}Duncan's multiple range test in all samples.

¹⁾Green tea leaves were harvested on spring (April 25th), summer (June 25th), and autumn (September 25th)

적으로 처리하여 가공한 찻잎은 GABA가 축적됨이 보고되어(Abe Y 등, 1995; Park, 2001), 찻잎의 GABA 함량을 높이기 위해 최적의 채엽시기, 품종, 가공조건에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다.

찻잎의 아미노산은 감칠맛과 향미에 관여하는 주요 성분으로써 수용성 성분으로 차에 부드러운 맛에 기인하며, 채엽시기가 늦어질수록 함량이 감소하는 것으로 알려져 있다(Kim 등, 2002). 본 실험에서 총 아미노산 함량은 채엽시기가 늦어질수록 보향 품종에서 증가하는 경향을 나타내었고 후순, 야부기다 그리고 참녹은 여름차에서 감소 후 다시 가을차에서 증가하는 경향을 보였다. 이는 실험에 사용된 품종 및 환경요인의 차이에서 기인한 것으로 판단된다. 따라서 찻잎의 종과 채엽 시기는 녹차의 테아닌, GABA를 비롯한 총 아미노산 함량을 결정하는 요인임을 본 연구와 선행연구를 통해 확인하였다.

탄닌, 총페놀, 플라보노이드 함량 및 항산화능 측정

채취시기에 따른 품종별 녹차의 탄닌 총페놀 및 플라보노이드 함량을 측정 후 ABTS와 DPPH radical 소거활성을 측정하였다. 그 결과(Table 2), 품종에 따라 달랐지만 채취 시기가 늦어질수록 탄닌 함량은 증가하는 것으로 나타났고, 가을에 채취한 참녹 가을차에서 23.6±0.1 mg/g로 가장 높은 탄닌 함량을 보였다.

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물 중의 하나로서 녹차에 다량으로 함유되어 있다고 알려져 있다(Woo 등, 2003). 본 실험에서 측정된 총페놀은 채취 시기별 품종에서 증감 경향이 달랐으며, 후순은 봄차에서 282.4±1.8 mg/g, 가을차에서 255.6±0.2 mg/g로 확인되어 채취시기가 늦어질수록 감소하는 경향을 보였고, 야부기다는 봄차에서 280.2±0.8 mg/g, 가을차에서 312.6±0.0 mg/g로 채취시기가 늦어질수록 증가하는 경향을 나타내었다. 플라보노이드는 재래 녹차와 참녹에서 채취시기가 늦어질수록 증가하는 것으로 나타났고, 후순, 야부기다, 보향에서 여름차 까지는 증가하다가 가을차에서 감소하는 경향을 나타내었다. Kang과 Shon(2007)의 보고에서 녹차의 플라보노이드류

는 myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, apigenine으로 확인되었고, 각 성분은 시기별로 증감의 경향이 달랐다. 이를 통해 본 실험에서 플라보노이드의 함량이 시료별 채취시기에 따라 같은 경향을 보이지 않는 것은 이러한 화합물들의 농도에 비례한 것으로 판단된다. 각 시료에 대한 ABTS는 후순, 보향, 참녹에서 플라보노이드 농도와 비례하는 경향을 보였으며, 재래 녹차와 야부기다는 총페놀의 농도와 비례하는 경향을 나타내었다. DPPH radical 소거능은 ABTS 활성의 증감과 비슷한 경향을 보였으며, 참녹을 제외한 모든 시료에서 여름차의 활성이 가장 높고 가을차에서 활성이 다시 감소하는 것을 확인하였다. Shin과 Han(2016), Kim 등(2014)이 식물 중에 존재하는 페놀성분은 항산화 활성을 나타낸다고 보고하고 있어, 찻잎에서 나타나는 항산화 활성은 각 시료에 존재하는 플라보노이드, 탄닌 등 페놀 성분에 의한 것으로 사료된다.

카테킨류 함량 조사

채취 시기별 품종에 따른 찻잎의 축합형 탄닌 성분인 카테킨 함량을 HPLC를 이용하여 측정하였다. 카테킨은 C6-C3-C6 골격을 가진 물질로서 차나무에는 ECg, EC, EGC, EGCG, C, GC 등 6종이 존재한다고 알려져 있다(Park 등, 2008). 본 실험에서 카테킨의 총 함량은 채취 시기가 늦어질수록 증가하는 경향을 보였는데, 이는 Yang 등(2012)이 분석한 하동지역 녹차의 채취시기(우전, 세작, 중작)가 늦어질수록 증가한다는 분석결과와 일치하였다. Ecg와 EGCg는 종과 관련없이 채취시기가 늦어질수록 증가하는 것으로 나타났고, Kim 등(2002)이 분석한 하동 화개면 녹차(4월 10일, 4월 17일, 4월 25일 채취)에서 채취시기가 늦어질수록 Ecg와 EGCg가 증가한다는 분석결과와 일치하였다. 그리고 EGC는 감소하는 경향을 보였는데 전남 보성군 득량면 소재의 시기별로 채취한 녹차(4월 초순, 5월 중순, 6월 중순, 7월 중순)의 카테킨 함량을 분석한 Kim 등(2004)의 보고에서 EGC 함량은 6월 까지 증가하다 7월부터 감소하는 것으로 나타나 7-8월이 지나면 EGC 함량은 감소된다고 판단된다. 한편 전체 카테킨 중 가

Table 2. Tannin, total phenol, flavonoid content and antioxidant activity (ABTS, DPPH) of green tea extract by 3 different harvest periods and 5 different cultivars

Harvest ¹⁾ Periods		Tannin (mg/g)	Total phenol (mg/g)	Total flavonoid (mg/g)	ABTS (%)	DPPH (%)
Spring	<i>Native</i>	17.3±0.1 ^e	275.4±0.8 ^e	402.1±4.7 ^a	46.6±0.1 ^d	72.8±0.1 ^a
	<i>Fushun</i>	18.4±0.1 ^d	282.4±1.8 ^c	378.1±0.7 ^b	46.7±0.0 ^d	65.0±0.7 ^d
	<i>Yabukita</i>	18.5±0.1 ^c	280.2±0.8 ^d	360.1±12.0 ^c	47.8±0.0 ^b	69.9±0.4 ^b
	<i>Bohyang</i>	20.1±0.1 ^b	293.8±0.4 ^b	334.8±9.3 ^d	54.2±0.0 ^b	67.3±0.7 ^c
	<i>Chamnok</i>	22.3±0.0 ^a	303.2±0.2 ^a	351.5±0.7 ^c	55.2±0.1 ^a	68.8±2.3 ^{bc}
Summer	<i>Native</i>	20.7±0.1 ^d	310.6±0.0 ^b	466.1±15.3 ^a	61.7±0.1 ^c	83.5±1.4 ^a
	<i>Fushun</i>	17.6±0.1 ^a	266.0±0.6 ^d	449.5±2.7 ^{ab}	54.6±0.1 ^d	75.5±1.0 ^b
	<i>Yabukita</i>	19.5±0.1 ^c	303.2±0.6 ^c	466.8±6.7 ^a	61.0±0.1 ^b	80.9±0.0 ^a
	<i>Bohyang</i>	21.5±0.0 ^b	266.4±0.2 ^d	435.5±3.3 ^b	67.0±0.1 ^a	75.2±1.1 ^b
	<i>Chamnok</i>	22.4±0.2 ^e	322.0±0.6 ^a	378.1±2.0 ^c	67.1±0.1 ^a	52.6±2.8 ^c
Autumn	<i>Native</i>	21.2±0.1 ^c	310.4±1.0 ^c	554.8±6.7 ^a	57.4±0.0 ^c	70.5±0.6 ^a
	<i>Fushun</i>	17.9±0.1 ^d	255.6±0.2 ^e	437.5±10.7 ^b	47.9±0.0 ^e	73.3±1.9 ^b
	<i>Yabukita</i>	22.0±0.2 ^c	312.6±0.0 ^b	430.8±16.0 ^b	64.7±0.1 ^b	75.8±1.2 ^{ab}
	<i>Bohyang</i>	21.0±0.1 ^c	295.2±1.4 ^d	381.5±13.3 ^b	56.5±0.0 ^d	69.4±2.2 ^b
	<i>Chamnok</i>	23.6±0.1 ^a	316.4±0.2 ^a	440.8±2.0 ^c	79.2±0.1 ^a	61.1±3.6 ^c

All values are Mean±SD (n=3) within each column followed by the same letter are not significantly different ($p<0.05$).

^{a-c}Duncan's multiple range test in all samples.

¹⁾Green tea leaves were harvested on spring (April 25th), summer (June 25th), and autumn (September 25th)

Table 3. Catechin contents in green tea extract by 3 different harvest periods and 5 different cultivars

Harvest ¹⁾ Periods		C	EC	ECg	EGCg	EGC	TC ¹⁾
(mg/g DW)							
Spring	<i>Native</i>	15.97±0.05 ^d	11.62±0.36 ^c	24.95±0.32 ^c	68.68±0.38 ^a	10.41±0.17 ^c	131.64
	<i>Fushun</i>	11.81±0.41 ^e	14.02±0.36 ^b	26.77±0.27 ^b	58.15±0.66 ^c	17.96±0.56 ^b	128.73
	<i>Yabukita</i>	19.23±0.31 ^c	12.07±0.32 ^c	28.81±0.33 ^a	68.00±0.51 ^{ab}	18.04±0.05 ^b	146.17
	<i>Bohyang</i>	29.61±0.32 ^a	18.35±0.29 ^a	23.91±0.36 ^c	67.88±0.17 ^{ab}	18.48±0.03 ^b	158.24
	<i>Chamnok</i>	26.91±0.12 ^b	19.32±0.33 ^a	26.72±0.23 ^b	65.92±0.87 ^b	19.91±0.12 ^a	158.79
Summer	<i>Native</i>	17.05±0.46 ^b	13.07±0.35 ^a	29.87±0.31 ^b	110.17±0.20 ^b	9.49±0.02 ^d	179.68
	<i>Fushun</i>	13.90±0.12 ^c	12.61±0.29 ^a	29.64±0.12 ^b	96.71±0.66 ^d	11.96±0.18 ^c	164.84
	<i>Yabukita</i>	14.49±0.48 ^c	12.91±0.20 ^a	29.73±0.42 ^b	104.37±0.60 ^c	10.11±0.27 ^d	171.63
	<i>Bohyang</i>	18.71±0.67 ^{ab}	12.24±0.36 ^a	25.18±0.29 ^c	117.1±0.31 ^a	15.24±0.16 ^b	188.48
	<i>Chamnok</i>	19.66±0.31 ^a	12.08±0.45 ^a	34.90±0.03 ^a	117.6±0.59 ^a	16.38±0.31 ^a	200.63
Autumn	<i>Native</i>	13.00±0.26 ^b	11.82±0.08 ^c	35.02±0.16 ^c	129.67±1.2 ^a	6.15±0.38 ^c	195.68
	<i>Fushun</i>	9.93±0.46 ^c	10.09±0.19 ^d	29.10±0.27 ^d	108.69±1.02 ^d	5.86±0.28 ^c	163.68
	<i>Yabukita</i>	15.88±0.19 ^a	13.85±0.38 ^b	35.97±0.48 ^{bc}	123.60±0.20 ^b	8.16±0.35 ^b	197.48
	<i>Bohyang</i>	13.95±0.43 ^b	13.85±0.29 ^b	37.05±0.04 ^b	117.82±0.76 ^c	11.18±0.14 ^a	193.86
	<i>Chamnok</i>	13.95±0.43 ^c	16.61±0.59 ^a	39.32±0.3 ^a	117.05±2.11 ^c	11.72±0.17 ^a	198.67

¹⁾C: catechin, EC: epicatechin, ECg: epicatechin gallate, EGCg: epigallocatechin gallate, EGC: epigallocatechin, TC: Total catechin

All values are Mean±SD (n=3) within each column followed by the same letter are not significantly different ($p<0.05$).

^{a-c}Duncan's multiple range test in all samples.

¹⁾Green tea leaves were harvested on spring (April 25th), summer (June 25th), and autumn (September 25th)

장 높은 함량을 나타내는 것으로 보고(Kim 등, 2002; Kim 등, 2004; Wee 등, 1999)되는 EGCg는 본 연구에서도 약 50% 이상의 가장 높은 함량을 보였다.

α-Glucosidase 및 HMG-CoA reductase 저해능 조사

α-Glucosidase는 차류에 들어있는 폴리페놀류에 의해 억제되는 것으로 알려져 있는데, 그 중 카테킨에 의해 활성이 억제되는 것이 보고되어 왔다(Toshiro 등, 2007; Meltem 등, 2002; Wataru 등, 2006). 특히 EGCg는 항 비만 및 항 당뇨병 효과가 있는 것으로

보고되어(Kao 등, 2006), 채취 시기에 따른 재래 녹차, 후순, 야부기다, 보양, 참녹의 α-glucosidase 저해 활성을 측정하였으며 acarbose를 대조군으로 하여 비교하였다(Fig. 1(A)). α-Glucosidase 저해 활성은 채취 시기가 늦어질수록 증가함을 보였고 그 중 여름, 가을에 채취한 참녹에서의 저해 활성이 72.93%로 가장 높은 저해활성을 보였다. 녹차, 홍차, 우롱차를 이용하여 α-glucosidase 저해능을 조사한 Xiaoping 과 Fanbin(2015)의 보고에 의해 차류의 폴리페놀류는 α-glucosidase를 비경쟁적으로 억제하는 것을 확인하였다. 특히 추출 온도에 따른 녹차의 α-glucosidase 저해능을

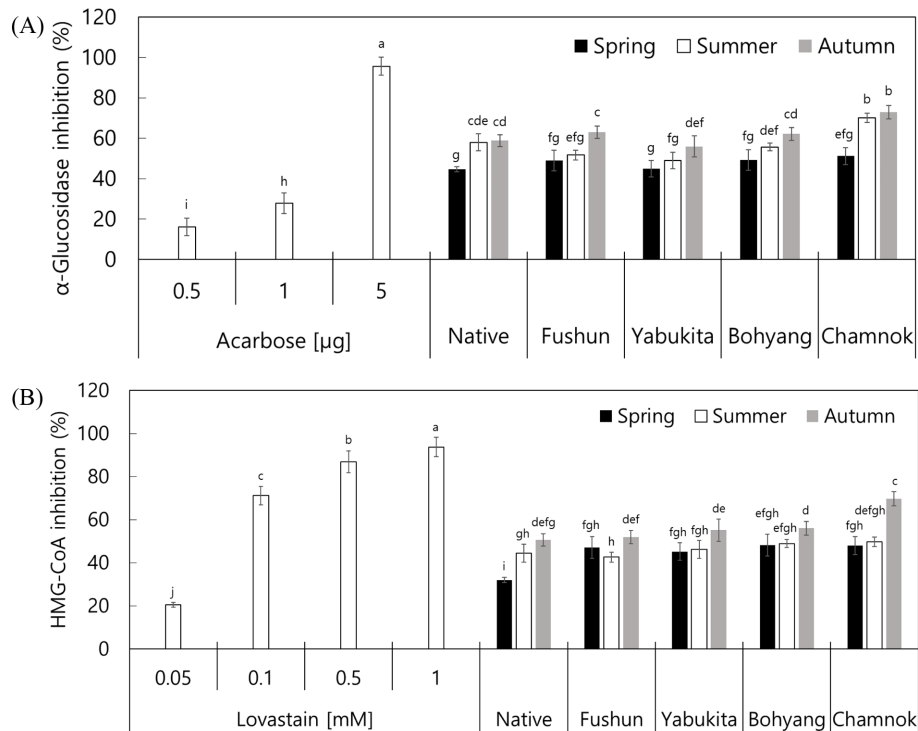


Fig. 1. Inhibition of α -Glucosidase activity (A) and HMG-CoA activity (B) of green tea extracts among 3 different harvest periods and 5 different cultivars. The 80% ethanol extracts of green tea (50 μ g/mL) were applied. Inhibitory effects of acarbose (0.5-5 μ M) on α -Glucosidase or lovastatin (0.05-1.0 mM) on HMG-CoA enzyme were performed to produce the control set of data for comparisons. Data are means \pm SD of three independent experiments.

조사한 Liu 등(2017)은 녹차의 폴리페놀류 중 EGCG를 비롯한 카테킨류는 뛰어난 α -glucosidase 저해능을 가진다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서 채취시기가 늦어질수록 EGCG를 비롯한 총 카테킨 함량의 증가(Table 3)가 녹차의 α -glucosidase 저해능에 기여한 것으로 사료된다.

한편 HMG-CoA로부터 mevalonate로 전환시키는 효소인 HMG-CoA reductase는 cholesterol 합성 기작의 주요 효소이며 인체의 간 부위에서 HMG-CoA reductase의 활성 저하는 LDL-receptor의 활성을 증가시켜 혈중 콜레스테롤 농도를 감소시킨다고 보고된다(Ha 등, 1998; Moon 등, 2002). Fig. 1(B)는 채취 시기에 따른 차재 녹차, 후순, 야부키다, 보양, 참녹의 HMG-CoA reductase 저해능을 나타낸 것이다. 본 실험에서 사용된 차재는 채취 시기가 늦을수록 HMG-CoA reductase 저해능이 높아지는 것을 보여 α -glucosidase 저해능과 같은 증가 경향을 보였으며, 가을차 참녹의 HMG-CoA reductase 저해능이 69.78%로 가장 높은 저해활성을 보였다. 따라서 가을차 참녹품종의 차재는 α -glucosidase 저해능과 HMG-CoA reductase 저해능에서 다른 품종에 비해 우수한 활성을 나타내었다. 이는 HMG-CoA reductase의 저해가 폐놀 화합물(Son 등, 2017), 카테킨(A. Kannan 등, 1995) 등에 의해 발생하는 것으로 알려져 있으며, 본 실험에서 나타난 가을차 참녹시료의 저해 활성은 같은 시기에 채취한 다른 품종에 비해 높은 탄닌, 총페놀, 폴리모노이드(Table 2) 함량과 총 카테킨 함량(Table 3)에서 기인한 것으로 판단된다.

뇌세포 보호 및 항스트레스 효과 조사

봄차 녹차 시료의 품종에 의한 뇌신경세포(SH-SY5Y)의 세포 독성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 뇌신경세포에 동일한 양의 품종별 녹차 시료를 처리하여 세포생존율을 MTT 방법을 통

해 조사하였다. 그 결과(Fig. 2(A)), 참녹을 처리한 시료에서 96.34%의 가장 높은 세포생존율을 보였고, 이는 대조군으로 사용한 0.1 mM theanine의 세포생존율인 92.24%보다 높은 값을 보였다. 차재 녹차, 후순, 야부키다, 보양의 처리에서는 65.01-71.55% 수준의 세포생존율을 보여 참녹에 비해 낮은 값을 나타내었다.

Cortisol은 각종 스트레스인자들에 의해 자율신경계가 흥분되며 혈장의 catecholamine과 함께 증가한다고 알려져 있다(Moss 와 Wynar, 1970; Dimsdal 과 Moss, 1980). 본 실험에서는 뇌신경세포(SH-SY5Y)에 대해 봄차 녹차 시료 품종에 대한 cortisol의 함량변화를 측정하여 항스트레스 효과와 기억력 개선효과를 조사하였다. Glutamate를 스트레스 인자로 하였고 그 결과(Fig. 2(B)), 참녹을 처리한 세포에서 269.2 ng/mL로 가장 낮은 cortisol 함량이 확인되어 대조군으로 첨가한 0.1 mM 테아닌 보다 우수한 스트레스 억제능을 보였다. 나머지 품종에서는 285.9-299.85 ng/mL 수준의 cortisol 함량이 측정되었다. Glutamate는 여러 가지 단계를 거쳐 hydroxy radical을 생성하여 신경세포를 손상시키는데(Lipton 등, 1993), 일반적으로 녹차의 테아닌과 GABA가 세포 자멸사와 같은 세포 사멸을 예방한다고 알려져 있다(Cho 등, 2008; Ikonovic 등, 1997).

한편 봄차 참녹 품종에서 신경세포에 대한 보호능과 항스트레스 측정에 대해 우수한 활성을 보였는데, 이는 같은 시기에 채취한 품종 중 가장 높은 총페놀 함량과(Table 2), 총 카테킨 함량(Table 3)을 미루어 보아, GABA나 테아닌 뿐만 아니라 다른 물질에 의해서도 영향을 받은 것으로 추측되며, 녹차의 카테킨 등 페놀 성분은 활성산소로 유도된 산화적 스트레스로부터 신경세포를 보호한다는 보고(Mandel 등, 2005)와 카테킨과 에피카테킨은 blood-brain barrier (BBB)를 통과하여 뇌 세포에 영향을 줄 수 있다는 연구 결과(Faria 등, 2011)등은 봄차로 채취한 참녹 품종

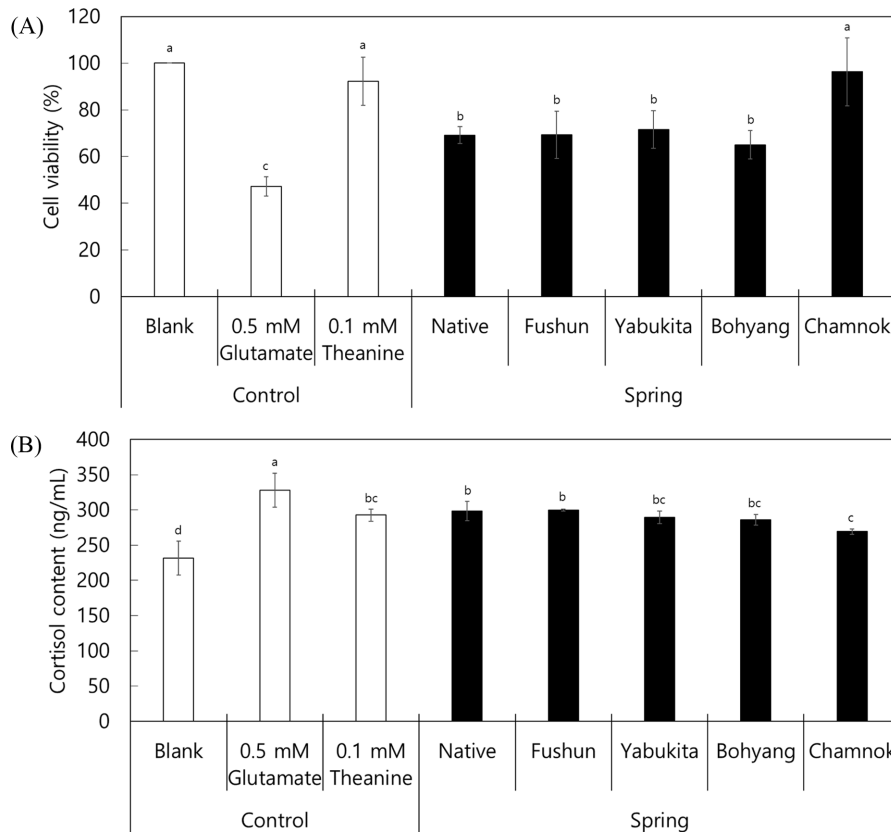


Fig. 2. SH-SY5Y brain cells protective effect (A) and anti-stress effect (B) of green tea extracts from 5 different cultivars in spring season. Cell viability (% of control) was determined by MTT assay. Each value is expressed as the mean±SD of three independent experiments. Water extract of green tea (50 µg/mL) were applied.

의 신경세포에 대한 보호능과 항스트레스는 함유된 GABA, 테아닌 뿐만 아니라 총페놀 성분과 카테킨 함유량에 의한 것으로 여겨진다.

5가지 국내, 외 품종의 성분 및 효능을 조사한 결과, 국내육성 품종인 참녹이 기능성 성분 및 생리활성 효과에서도 가장 우수하게 나타났다. 테아닌, 가바의 함량의 경우(Table 1), 봄에는 외래종보다 조금 적었으나 여름, 가을에는 가장 높았으며 탄닌, 페놀성 화합물(Table 2), 카테킨 함량(Table 3)과 항산화 효과(Table 2)는 채취 시기와 상관없이 품종별로 가장 높은 함유량을 보였다. 또한, 다이어트 효과 조사를 위한 α-Glucosidase 및 HMG-CoA reductase 저해능 측정결과(Fig. 1)에서도 모든 채취 시기에서 품종 중 가장 우수한 다이어트 효과를 나타냈다. 봄에 채취한 녹차 잎 추출물을 이용한 뇌신경세포에 대한 보호능과 항스트레스 측정 결과(Fig. 2), 참녹 품종이 뇌세포보호효과가 가장 높고 스트레스호르몬 함량이 가장 낮게 나타났다.

요약

본 연구에서는 녹차 국내종(보향, 참녹), 외래종(후순, 야부기다)의 채취시기를 달리하여 테아닌, GABA 등 유용 성분 함량을 분석하였고, 항산화능, α-glucosidase 활성 억제, HMG-CoA 저해능, 세포독성 측정, 뇌 신경세포 보호 효과, 항 스트레스 효과를 조사하여 유용 성분과의 상관성을 파악하고자 하였다. 테아닌과 GABA 함량은 모든 품종에서 채취시기가 늦어질수록 함량이 감소하는 경향을 나타내었다. 총 아미노산 함량에서는 채취시기가

늦어질수록 보향 품종에서 증가하는 경향을 나타내었고 후순, 야부기다 그리고 참녹은 여름차에서 감소 후 다시 가을차에서 증가하는 경향을 보였다. 총페놀과 플라보노이드의 함량과 항산화능을 조사했을 때 ABTS는 후순, 보향, 참녹에서 플라보노이드 농도와 비례하는 경향을 보였으며, 재래 녹차와 야부기다는 총페놀의 농도와 비례하는 경향을 나타내었다. DPPH radical 소거능은 참녹을 제외한 모든 시료에서 여름차의 활성이 가장 높고 가을차에서 활성이 다시 감소하는 것을 확인하였다. 카테킨류 측정에서 EGCg 함량은 카테킨류에서 50% 이상을 차지했고, 총 카테킨 함량과 Ecg, EGCg는 종과 관계없이 채취 시기가 늦어질수록 증가하는 경향을 보였으며 EGC는 감소하는 경향을 보였다. 품종별 봄, 여름, 가을차를 시료로 하여 측정된 α-glucosidase 저해 활성과 HMG-CoA reductase 저해능은 채취 시기가 늦어질수록 증가함을 보였고 그 중 가을에 채취한 참녹에서의 저해 활성이 각각 72.93%, 69.78%로 두 저해능 측정에서 가장 높은 저해활성을 보였다. 또한 뇌신경세포(SH-SY5Y)를 이용한 세포 독성 측정에서 참녹 품종이 96.34%로 가장 높은 세포생존율을 보였고 항 스트레스 측정에서 269.2 ng/mL로 가장 낮은 cortisol 함량이 확인되었다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 PJ 012565)의 지원에 의해 이루어진 결과이며, 이에 감사드립니다.

References

- Abe Y, Umemura S, Sugimoto K, Hirawa N, Kato Y, Yokoyama N, Yokoyama T, Iwai J, Ishii M. Effect of green tea rich in γ -aminobutyric acid on blood pressure of Dahl salt-sensitive rats. *Am. J. Hypertens.* 8: 74-79 (1995)
- Abeyasinghe DC, Li X, Sun C, Zhang W, Zhou C, Chen K. Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chem.* 104: 1338-1344 (2007)
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 181: 1199-1200 (1958)
- Byun JO, Han JS. A study on perception and actual status of utilization for green tea. *Korean J. Food Culture.* 19: 184-192 (2004)
- Cho HS, Kim S, Lee SY, Park JA, Kim SJ, Chun HS. Protective effect of the green tea component, L-theanine on environmental toxins-induced neuronal cell death. *Neurotoxicology.* 29: 656-662 (2008)
- Choi CY, Park EH, Joo YW, Kim MD. Increase of epigallocatechin in green tea extract by lactic acid bacteria fermentation. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 44: 62-67 (2016)
- Crespy V, Williamson G. A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. *J. Nutr.* 134: 3431-3440 (2004)
- Dimsdale JE, Moss J. Short-term catecholamine response to psychological stress. *Psychosom. Med.* 42: 493-497 (1980)
- Duval B, Shetty K. The stimulation of phenolics and antioxidant activity in pea (*Pisum sativum*) elicited by genetically transformed anise root extract. *J. Food Biochem.* 25: 361-377 (2001)
- Faria A, Pestana D, Teixeira D, Couraud PO, Romero I, Weksler B, Freitas V de, Mateus N, Calhau C. Insights into the putative catechin and epicatechin transport across blood-brain barrier. *Food Funct.* 2: 39-44, 2042-6496 (2011)
- Ha TY, Cho IJ, Lee SH. Screening of HMG-CoA reductase Inhibitory activity of ethanol and methanol extracts from cereals and legumes. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 224-229 (1998)
- Hakamata W, Nakanishi I, Masuda Y, Shimizu T, Higuchi H, Nakamura Y, Saito S, Urano S, Oku T, Ozawa T, Ikota N, Miyata N, Okuda H, Fukuhara K. Planar catechin analogues with alkyl side chains: a potent antioxidant and an α -glucosidase inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* 128: 6524-6525 (2006)
- Han YS. Gamma-aminobutyric acid content in commercial green tea. *Korean J. Food Cook. Sci.* 23: 409-412 (2007)
- Han SK, Song YS, Lee JS, Bang JK, Suh SJ, Cho JY, Moon JH, Park KH. Changes of the chemical constituents and antioxidant activity during microbial-fermented tea (*Camellia sinensis* L.) processing. *Korean J. Food Sci. Technol.* 42: 21-26 (2010)
- Ikonovic S, Kharlamov E, Manev H, Ikonovic MD, Grayson DR. GABA and NMDA in the prevention of apoptotic-like cell death *in vitro*. *Neurochemistry Int.* 31: 283-290 (1997)
- Jang JS, Lee BS, Kim YG. Changes in γ -aminobutyric acid (GABA) and the main constituents by a treatment conditions and of anaerobically treated green tea leaves. *Korean J. Food Sci. Technol.* 24: 315-319 (1992)
- Kang SK, Shon MY. Changes of bioactive compounds and antioxidant activities in Korean Green Tea (*Camellia sinensis*) with different harvesting periods. *Korean J. Food Preserv.* 14: 709-715 (2007)
- Kao YH, Chang HH, Lee MJ, Chen CL. Tea, obesity, and diabetes. *Mol. Nutr. Food Res.* 50: 188-210 (2006)
- Kim BK, Park CE, Park KJ, Lim JH, Jeong JW, Jeong SW, Cho CW. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Green Tea at Different Harvest Time. *J. East Asian Soc. Diet. Life.* 19: 570-578 (2009)
- Kim BS. Comparison of caffeine, free amino acid, vitamin C and catechins content of commercial green tea in *Bosung, Suncheon, Kwangyang, Hadong*. *J. Korean Tea Soc.* 8: 55-62 (2002)
- Kim YS, Hwang JW, Park PJ, Jeong JH. Antioxidant activity and protective effects of extracts from chrysanthemum boreale on t-BHP induced oxidative stress in Chang cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 43: 60-66 (2014)
- Kim S, Yoon SW. Analytical study for the effects of green tea with GABA about the brain wave and short-term memory. *J. Korean Jungshin Sci. Soc.* 2: 84-91 (1998)
- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS V, Sucher NJ, Loscalzo J, Single DJ, Stamier JS. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature.* 364: 626-632 (1993)
- Liu S, Ai Z, Qu F, Chen Y, Ni D. Effect of steeping temperature on antioxidant and inhibitory activities of green tea extracts against α -amylase, α -glucosidase and intestinal glucose uptake. *Food Chem.* 234: 168-173 (2017)
- Mandel SA, Avramovich-Tirosh Y, Reznichenko L, Zheng H, Weinreb O, Amit T, Youdim MB. Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection. *Neurosignals.* 14: 46-60 (2005)
- Matsui T, Tanaka T, Tamura S, Tushima A, Tamaya K, Miyata Y, Tanaka K, Matsumoto K. α -glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. *J. Agr. Food Chem.* 55: 99-105 (2007)
- Moon YJ, Yeom KH, Sung CK. Screening of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitors in vitro and its application to pullets. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 15: 307-313 (2002)
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65: 55-63 (1983)
- Moss AJ, Wynar B. Tachycardia in house officers presenting cases at grand rounds. *Ann. Intern. Med.* 72: 255-256 (1970)
- Park JH. Effect of anaerobic treatments on the γ -aminobutyric acid and quality of green tea (*Camellia sinensis* var. *sinensis*). *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* 9: 26-32 (2001)
- Park JD. Changes of some chemical compounds of Korean (*Posong*) green tea according to harvest periods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 542-546 (2004)
- Park SG, Kim TI, Lee WK, Park HK, Hong JT. Combination of green tea extract and L-theanine alleviates electric foot shock induced stress by modulating neurotransmitters in mice. *Yakhak hoeji.* 53: 241-249 (2009)
- Park JH, Kim YO, Nam SH, Kim JK. Effect of plucking season and days on main component content of green tea. *J. Korean Tea Soc.* 14: 167-174 (2008)
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical. Bio. Med.* 26: 1231-1237 (1999)
- Shin DS, Han GJ. Chemical compositions and antioxidant activities of Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*) stems and fruit. *Korean J. Food Preserv.* 23: 89-96 (2016)
- Son KH, Lee JY, Lee JS, Kang SS, Sohn HY, Kwon CS. Screening of phenolic compounds with inhibitory activities against HMG-CoA reductase. *J. Life Sci.* 27: 325-333 (2017)
- Sung NY, Song HY, An DH, You YC, Byun EB, Jang BS, Park CH, Park WJ, Byun EH. Antioxidant and neuroprotective effects of green tea seed shell ethanol extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 45: 958-965 (2016)
- Valsa AK, Ushajumari B, Vijayalakshmi NP. Effect of catechin on lipid metabolism. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 19: 175-182 (1995)
- Wee JH, Moon JH, Park KH. Catechin content and composition of domestic tea leaves at different plucking time. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 20-23 (1999)
- Woo HS, Choe HJ, Han HS, Park JH, Son JH, An BJ, Son GM, Choe C. Isolation of polyphenol from green tea by HPLC and its physiological activities. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 1199-1203 (2003)
- Yang JK, Kim JC, Lee JK, Jo JS. The Changes of chemical composition of green tea by picking periods. *J. Agric. Life Sci.* 46: 49-61 (2012)
- Yang X, Kong F. Evaluation of the in vitro α -glucosidase inhibitory activity of green tea polyphenols and different tea types. *J. Sci. Food Agric.* 96: 777-782 (2016)
- Yilmazer MS, Griffith AM, Michels AJ, Schneider E, Frei B. Grape seed and tea extracts and catechin 3-gallates are potent inhibitors of α -amylase and α -glucosidase activity. *J. Agr. Food Chem.* 60: 8924-8929 (2012)