

산 · 학 · 연 논문

기능성 소재로서의 탄나아제 전환 녹차

홍양희^{1,2} · 정은영^{1*}¹고려대학교 식품영양학과²고려대학교 보건과학연구소

Biotransformation of Green Tea with Tannase as a Functional Material

Yang-Hee Hong^{1,2} and Eun Young Jung¹¹Department of Food and Nutrition, Korea University, Seoul 136-703, Korea²Research Institute of Health and Sciences, Korea University, Seoul 136-703, Korea

서 론

녹차는 차나무(*Camellia sinensis* L.)에서 어린 잎을 채취하여 수분 함량을 5% 이하로 건조시킨 다음, 차 잎의 추출과정에서 산화되는 색상에 따라 백차, 홍차와 녹차 등으로 구분되어 사용되고 있으며, 국내에서는 매년 약 250만 톤 규모 이상의 녹차가 지리산 계곡이나 섬진강 유역 그리고 제주도 서귀포 지역에서 연 평균 기온 15°C 이상과 연 평균 강우량이 1,500 mm 이상인 자연환경에서 재배되고 있다. 하지만 녹차는 원료의 타입, 재배방법, 기후 등에 의해 영향을 많이 받는다고 알려지고 있으며, 특히 녹차에 함유되어 있는 카테킨들(catechins)의 양이나 질은 pH, 온도, 효소처리 등의 추출조건이나 방법에 따라서 크게 좌우된다고 보고되고 있다(1).

녹차에서 발견되는 폴리페놀은 분자 내 몇 개 이상의 페놀성 수산기를 가진 섬유질(cellulose), 리그닌(lignin), 카테킨 등으로 이루어져 있으며, 녹차의 카테킨에는 (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin(EGC), (-)-epicatechingallate(ECG)와 (-)-epigallocatechingallate (EGCG)가 있다(2)(Fig. 1). 이 중에서 EGCG는 녹차 카테킨 중 가장 많은 양을 차지하고 있으며, 가장 강력한 항암효과를 가지고 있다고 알려지고 있다(3). 그러나 EGCG는 낮은 생물학적 효과와 더불어 낮은 흡수율 그리고 중성이나 알칼리성 용액에 불안정성을 가지고 있는 제한점이 있다는 연구보고도 있다(4). 특히 EGCG는 DNA 손상을 야기하며 인체 세포주에서는 염색체 이상(chromosome aberration)과 자매염색분체교환(sister chromatid exchanges)을 유도하고(5), 동물 실험에서 대장암 유발을 강화시킬 수 있다고 보고되기도 하였다(6,7). 따라서 녹차의 이용성을 증

대시키기 위해서는 녹차의 대부분을 차지하고 있는 주요 카테킨인 EGCG의 위험성 억제에 대한 연구가 요구되며 이에 EGCG를 보다 안전하고 효과적으로 사용할 수 있는 카테킨의 전환을 유도하는 방안이 제안되고 있다.

Tannin acyl hydrolase(E.C. 3.1.1.20)은 일반적으로 탄나아제(tannase)로 불려지고 있으며, 곰팡이, 효모나 세균 등에 의해 생산되는 효소이다. 탄나아제는 'ester' 결합이나 'depside' 결합에 작용하는 분해 효소로서 녹차의 ECG와 EGCG를 각각 EC와 EGC로 전환시키고 갈릭산(gallic acid)을 유리시킨다(8)(Fig. 2). EGCG에서 유리된 EGC가 증가할수록 효과는 증가하여 탄나아제를 처리한 녹차는 탄나아제를 처리하지 않은 녹차보다 발암물질인 *N*-nitrosodimethylamine(NDMA)에 대하여 독성을 억제시키는 효과가 크다고 보고되고 있다(9). 또한 탄나아제에 의해 유리된 갈릭산은 항산화력을 유의하게 증가시키기 때문에 매우 유용하게 생각되고 있다(10). 이처럼 탄나아제는 EGCG를 EGC와 갈릭산으로 분해함으로써 항산

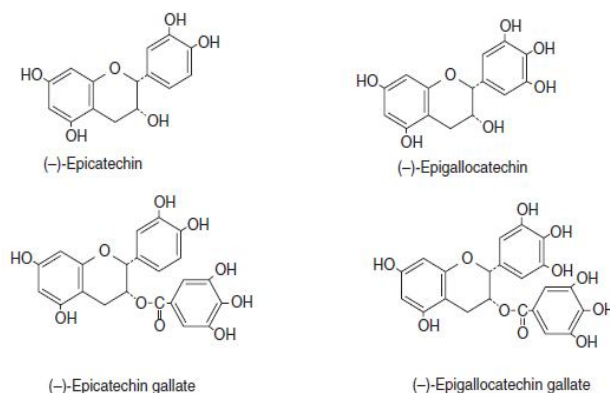


Fig. 1. Chemical structure of major catechins in green tea.

*Corresponding author. E-mail: ohappy02@yahoo.co.kr
Phone: 02-940-2858, Fax: 02-940-2850

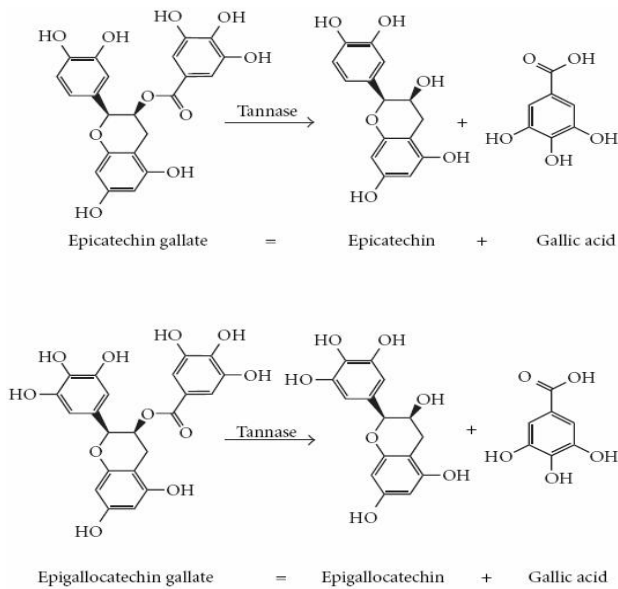


Fig. 2. Degalloylation of EGCG and ECG by the tannase.

화력을 기반으로 한 생리활성을 향상시키며 EGCG에 대한 위험성을 감소시킬 수 있어 최근 녹차에 탄나아제 처리 과정의 적용은 새롭게 주목을 받게 되었다.

이에 탄나아제 처리에 대한 효과 검증이 요구되고 있지만 녹차 카테킨에 대한 대부분의 연구는 EGCG에 집중되어 있으며 탄나아제에 의한 카테킨들의 전환에 관한 연구나 이에 대한 생리활성에 관련한 연구는 많이 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 탄나아제를 이용하여 생물전환시킨 녹차추출물에 대한 효과를 여러 논문들을 고찰하여 알아보았고, 기능성 소재로서의 응용가능성을 살펴보고자 하였다.

본 론

갈릭산(Gallic acid)의 생산

갈릭산은 녹차, 홍차, 포도주, 커피, 머루 등에 많이 함유되어 있는 탄닌(tannin)을 구성하는 주요 페놀성 물질로서 (antioxidation), 항알러지(antiallergic), 항돌연변이(anti mutagenic) 등의 활성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다 (11). 탄나아제의 가장 중요한 사용법은 탄닌이 풍부한 식품에서 부산물로 갈릭산을 만들어 내는 것이다(Fig. 3). 갈릭산은 단백질과 결합할 수 있는데 칼슘이나 아연과 같은 몇몇 무기질들의 약물학적 생리활성에도 영향을 미쳐 (12), 갈릭산은 살균제인 트리메소프림(trimethoprim), 항박테리아제 등 기능성 약제를 만드는 과정에도 사용되고 (13), 식품산업에서는 보존제로 사용되고 있다. 갈릭산은 화학적으로 합성되기도 하는데 이러한 과정은 비용이 많이 들고, 선택적으로 이루어지므로, 탄나아제 사용으로 생산되는 갈릭산은 많은 곳에 적용되고 있다(14).

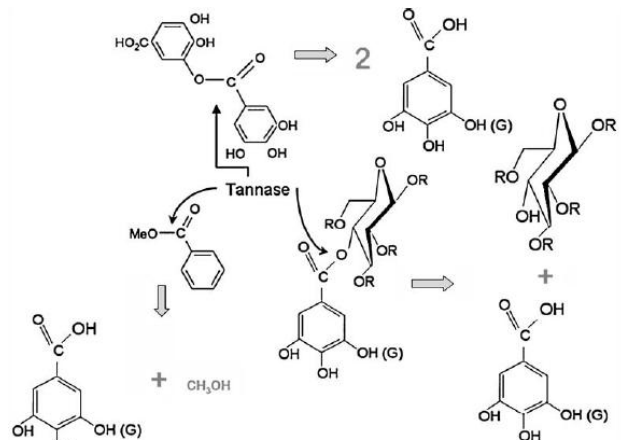


Fig. 3. Gallic acid production mechanism of active of tannase.

최근 Chung 등(15)은 갈릭산이 hydrogen peroxide로 인한 손상으로부터 피부멜라닌 세포를 보호하는 효과가 있음을 보고한 바 있으며, Jhoo(16)는 발효차 중의 미량성분인 갈릭산 산화물인 purpurogallin carboxylic acid가 항염 효능이 있음을 보고하였다. Park(17) 연구의 실험결과에서는 갈릭산은 케모카인과 성장인자 증가와 연관된 다양한 염증질환들, 예를 들면, interferon-inducible protein(IP)-10와 keratinocyte-derived chemokine(KC)의 증가와 관련된 중추신경계염증질환, vascular endothelial growth factor(VEGF)의 증가와 관련된 자궁내막증, monocyte chemoattractant protein(MCP)-1 증가와 관련된 죽상동맥경화증, macro phage-colony stimulating factor(M-CSF) 증가와 관련된 자가면역성 관절염 등에 응용될 수 있음을 의미한다고 하였다. 이런 이유로 Des-champs와 Lebeault(18)은 탄나아제를 이용하여 좀 더 선택적으로 많은 갈릭산의 수율을 만들어낼 수 있다면 생명공학을 비롯한 여러 분야에서 큰 수익을 올릴 수 있을 것이라고 하였다.

탄나아제로 생물전환시킨 녹차의 tea cream 억제 효과 건강에 기능성이 있다고 알려진 녹차를 소재로 여러 가지 제품이 증가하는 추세이지만 녹차에 존재하는 탄닌은 식품 가공 시 침전 및 혼탁물을 형성하고 짙은 맛을 나타내어 제품 개발에 어려움이 있다. 탄닌은 탄닌의 hydroxyl기와 단백질의 활성부위와 공유결합에 의한 반응으로 고도의 소수성 아미노산 잔기와 소수성 결합과 수소결합을 포함하는 2단계 기작에 의해 탄닌 복합체의 침전물을 형성한다(19). 또한 탄닌은 단백질과 결합하는 능력이 강하므로 단백질의 소화를 억제하고 비타민 B₁₂와 결합하여 효소의 활성을 억제하는 문제점이 있다(20).

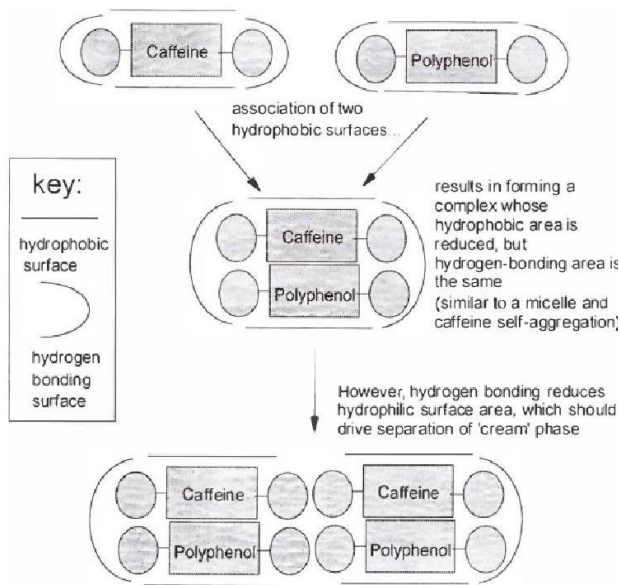


Fig. 4. Tea cream formulation pathway.

차 음료는 주로 인스턴트 차로 생산되어, 뜨겁거나 차갑게 추출하여 마시는데 냉각하는 과정에서 침전물이 발생하여 혼탁해지는 것을 tea cream이라고 한다. 이러한 현상은 저장 과정이 길어질수록 악화되어 소비자들로 하여금 구매욕구를 불러 일으키지 못하도록 한다. 차 추출물 안의 tea cream의 양은 화학적인 구성에 기인하는데 갈릭산과 결합되어 있는 카테킨들이 갈릭산과 결합되지 않은 카테킨들보다 보다 더 강력한 creaming 능력을 가진다(21). 폴리페놀이 단백질과 상호작용하여 침전물을 유발하기 때문에 특별히 EGCG의 galloyl groups은 단백질의 상호작용에 중요한 역할을 하여 불용성 형태의 tea cream을 만든다. 탄나아제에 의한 가수분해작용은 ester 결합의 절단으로 인해 EGCG가 단백질과 결합하는 능력을 감소시켜 차를 저장하는 동안 고분자들의 결집을 막아 침전물을 적게 만드는 것으로 예상된다(Fig. 4). 많은 연구논문에서 인스턴트 차 음료에 탄나아제를 적용하여 tea cream을 감소시

켰다고 보고하고 있고(22-24), 현재 탄나아제로 처리한 후의 녹차추출물은 향이나 맛 등의 관능 특성의 변화도 생길 수 있다는 보고들이 나오기도 한다(25,26). Kim 등(27)의 연구에서는 탄나아제로 처리한 녹차의 pH는 유의적으로 차이가 없었으나 탁도는 탄나아제 무처리군은 1.38, 효소 처리군은 0.81로 맑아짐으로써 탄나아제에 의한 녹차의 청정효과로 볼 수 있는 유의적인 차이를 보고하였고, Raghuwanshi 등(28)도 탄나아제로 처리한 홍차가 대조군에 비하여 tea cream이 감소한다고 하였다.

탄나아제에 의해 카테킨들의 ester 결합이 가수분해되면 갈릭산이 분해되면서 분자의 무게가 적은 수용성 물질들이 분리되어, 탁도는 줄어들고 찬물에서도 차가 잘 우려나오게 된다. 그러므로 탄나아제는 차를 가공하는 과정에서 tea cream을 가수분해 시키기 위해 널리 사용되고 있다(29). 음료들을 가공하는 과정에서 가장 중요한 요인은 찬물에서도 잘 용해되는 제품을 생산하는 것이고, 이것은 4°C 이하이거나 차를 저장하는 과정에서 tea cream은 생성되기 때문에 인스턴트 차를 제조하는 과정에서 굉장히 중요한 문제이다. 소비자들은 깨끗한 제품을 선호하므로 거품을 형성하여 탁하게 만드는 화합물들은 제품에 생산되는 과정에서 반드시 제거되어야 하기 때문에 화학적인 정화제를 사용하여 tea cream을 제거하기도 한다. 침전물을 제거하여 찬물에도 잘 우려나올 수 있도록 만든 차들은 음료의 맛과 향의 질에도 영향을 미치므로 탄나아제를 이용하여 탄닌으로부터 갈릭산을 제거하여 찬물에서도 차의 폴리페놀이 잘 우려나올 수 있게 만든다. 즉 탄나아제는 생물학적으로 전환되지 않은 차의 앞에 존재하는 다양한 화합물들과 galloyl group 사이에 있는 ester 결합의 가수분해를 촉진시킨다(30)(Table 1). 그러므로 tea cream을 유발하는 물질들의 제거는 좋은 색과 좋은 용해도를 가지는 인스턴트 차를 생산해야 하는 과정에서 중요한 문제이고, 높은 수율을 내기 위해 녹차의 생물학적 전환 공정은 탄나아제를 처리한 후에 가능해진다.

Table 1. The major groups of tannins as substrates for tannase with their representative types and main

Groups of tannins	Hydrolytic reactions catalyzed by tannase	Sources
Hydrolysable tannins	Gallotannins e.g. tannic acid (commercial name of Chinese gall tannins); yield gallic acid and glucose on hydrolysis.	Tara pods, gall nuts, sumac leaves etc.
	Ellagitannins; yield ellagic acid and glucose on hydrolysis.	Wood of oak, chestnut, myrobalan etc.
Catechin tannins	Catechin and epicatechin Gallates; yield catechin, epicatechin and gallic acid on hydrolysis; have properties of hydrol-ysable and condensed tannins.	Tropical shrub legumes, tea leaves etc.
Condensed tannins	Polymeric proanthocyanidins; yield monomeric flavonoids such as flavan-3,4-diols and flavan-3-ols on hydrolysis e.g., quebracho tannins from the wood of quebracho tree.	grapes, apple, olives, beans, sorghum grains, carob pods, cocoa, coffee, besides tree bark, heart wood etc.

탄나아제로 생물전환시킨 녹차의 관능증진 효과

녹차의 카테킨은 전체 가용성 성분의 절반을 차지하며, 차의 맛, 색과 향기 등에 큰 영향을 줄 뿐만 아니라 강한 항산화 작용을 한다고 알려져 있다. 지금까지 보고된 녹차의 카테킨 함량은 일반적으로 8~12% 정도이며, 카테킨들 중 EGCG의 함량이 가장 높았으며, 나머지 카테킨들의 성분은 제조 공정에 따라 함량 차이에 변화를 보이고 있다. 또한 차에는 비타민과 무기질의 영양소를 공급하는 기능과 맛과 향 등의 기호를 충족시키는 기능이 있으며, 쓴맛은 주로 각성작용, 이뇨작용, 피로회복 작용 등이 있는 것으로 알려진 카페인(cafeine)에 의한 것이며, 차의 쓴맛과 더불어 떫은 맛을 내는 녹차의 주요 카테킨으로는 EC, ECG, EGC, EGCG 등으로 알려져 있고(31), 특유의 독특한 맛을 내는 성분은 테아닌(theanine)으로 이 중 글루탐산(glutamic acid)의 ethylamide가 약 절반을 차지하고 있으며, 이 외에 20여 종류의 아미노산이 함유되어 있다(32). 이 중에서 떫은 맛을 내는 탄닌을 효소를 이용하여 분해하면 맛, 향, 탁도 개선, 제품의 수율 및 품질 향상의 장점이 있다고 알려지고 있다(25).

차는 하나의 기호식품이기 때문에 저장 중에 맛이나 향이 변할 경우에는 가치가 없어지게 되므로, 차 본래의 맛과 향을 유지하는 것이 매우 중요하다. Lu 등(26)은 4주 저장 후에 탄나아제로 처리한 녹차추출물의 식감, 맛, 그리고 전체적인 외관의 관능 평가가 그렇지 않은 것보다 더 질이 우수했다고 보고하고 있다. 녹차에서 카테킨들은 떫은 맛을 내지만 각각 떫은 맛의 정도가 다르다. EC와 EGC 등과 같은 유리형 카테킨이 ECG나 EGCG보다 쓴맛이 온화하며, 떫은 맛이 덜하다고 알려지고 있다(33). 탄나아제로 처리하지 않은 녹차 안에는 차 카테킨 중 EGCG가 가장 많은 비율을 차지하고 있는데, 이것은 저장하는 동안 쉽게 단백질과 결합한다. 따라서 차의 향미나 전체적인 외관에 영향을 미치게 된다. 이런 이유로 탄나아제로 처리한 녹차의 향미나 질이 더 좋아지고, 생리활성효과도 저장하는 동안 카테킨 함량의 유지되어 증가된다(26).

또한 다른 연구에서는 탄나아제에 의한 녹차품질향상의 가능성을 연구하기 위해 탄나아제를 차 잎에 섞은 후 생화학적 구성을 분석하였는데, 대조군과 탄나아제로 처리한 녹차 추출물 두 샘플간의 폴리페놀의 전체 함량은 실질적인 차이가 없었으나, 맛에 영향을 미치는 아미노산의 함량은 탄나아제로 처리한 녹차 추출물이 처리하지 않은 녹차추출물보다 약간 높았다. 이러한 변화는 차의 품질을 높이는 긍정적인 측면으로 작용하여 녹차의 불쾌한 맛이나 냄새를 줄이도록 이끌고, 부드러운 맛을 강화시킨다고 하였다(34). 비슷한 결과로 Kim 등(27)의 연구에서도 떫은 맛의 척도를 1점은 매우 약하다, 5점은 매우 진하다

로 관능 평가한 결과 탄나아제 무처리 녹차의 평점은 4.6, 그리고 탄나아제로 처리한 녹차의 평점은 1.6으로 녹차에 탄나아제를 처리하면 가장 떫은 맛이 강한 EGCG가 완전히 분해되어 수용성 탄닌에 의해 발생하는 떫은 맛이 크게 감소된다고 하였다. Raghuwanshi 등(28)은 홍차를 탄나아제로 처리하였을 때 색, 밝기와 향미 등이 증가하여 홍차의 질을 높이는 것으로 보고했다. 와인 색깔의 50%는 탄닌의 존재로 발색되는데 만약 이 탄닌들이 공기와 접촉하여 산화된다면 색깔이 탁해지고 제품의 질에 심각한 문제를 유발하게 되는데, Powell 등(34)은 탄나아제를 이용하여 포도주스의 페놀성 물질들을 제거하면 화학적으로 안정해지며, 이런 문제를 해결할 수 있는 가장 좋은 방법은 탄나아제를 사용하는 것이라고 하였다.

또한 녹차의 품질을 평가하는데 있어서 차잎의 색도는 선명하고 짙은 녹색일수록 고품질로 평가받기 때문에 녹차의 색도도 중요한 품질지표이다. 녹차의 가공 중 차잎에 들어있는 엽록소가 변성되거나 붉은색, 검푸른색 등의 결점이 유발되었을 경우 차의 품질평가 시 큰 감점 요인이 된다(35). 이러한 녹차의 색도는 품종 고유의 특성에 따라 차이가 있으나, 가공조건에 따라서도 변화한다. 차의 색깔은 저장하는 동안 폴리페놀류들이 산화하기 때문에 점차적으로 어두워진다. 이것은 tea cream을 유발하게 되며, 이런 이유로 녹차의 항산화 효과는 감소하게 된다(36).

Lu 등(26)의 연구에서는 4주 저장기간 후에 일반 녹차추출물의 탁도가 탄나아제로 처리한 녹차추출물보다 유의적으로 더 증가한 것을 보여줬다. Hunter L(brightness), a(green/red chromaticity)와 b(yellow chromaticity)의 수치는 탄나아제로 처리한 녹차추출물의 L value는 조금 감소하기는 했지만 유의적인 차이는 없었고, a와 b values는 4주 저장기간 후에도 거의 변화가 없었다. 그러나 일반 녹차추출물은 저장기간 동안 L value는 유의적으로 감소하였는데, 이것은 일반 녹차추출물의 밝기가 탁해지고 흐려졌음을 나타내고, a value는 증가하였는데 이것은 차의 색깔이 점차 붉은색으로 변하였음을 의미한다. 그리고 b value 또한 점차적으로 증가하였는데 이것은 차가 노란색으로 변하였음을 가리킨다. 이런 이유로 일반 녹차추출물의 전체적인 외관은 저장기간 동안 유의적으로 변하였지만 그에 반하여 탄나아제로 처리한 녹차추출물은 거의 변화가 없다고 하였다.

탄나아제는 EGCG를 EGC와 갈릭산으로 분해함으로써 홍차음료의 혼탁 방지, 녹차음료의 쓴맛 억제, 맥주의 투명화, 과즙음료의 침전 억제 등 여러 용도로 사용할 수 있다. 특히 일본에서는 녹차음료에선 맛이나 카테킨 함유량 등에 영향을 미치지 않고 쓴맛이나 혼탁을 억제할 수 있기 때문에 여러 상품들에 이용되고 있다.

탄나아제로 생물전환시킨 녹차의 라디칼 소거능 효과
녹차는 차나무의 어린 잎을 따서 찌거나 열을 가해 효소의 작용을 억제시켜 말린 기호품으로서 세계적으로 널리 음용되고 있으며 카페인, 탄닌, 카테킨, 비타민 및 무기염류 등이 다량 함유되어 있어 다양한 생리기능적인 특성과 높은 항산화 작용을 가지는 천연물질로 보고되고 있다(37). 차의 높은 항산화 능력은 차의 성분 중 10~30%를 차지하고 있는 카테킨들이 대표적인 생리활성 물질로 알려져 있다. 이중에서 EGCG는 녹차 카테킨 중 가장 많은 양을 차지하고 있으며, 가장 강력한 항암효과를 가지고 있다고 알려지고 있다(38,39). 또한 Chen 등(40)은 녹차의 실험에서 비타민 E 등의 합성제보다 항산화 작용이 우수한 것으로 나타났다. 이렇듯 녹차를 통해 얻을 수 있는 가장 큰 이득은 항산화 효과를 통한 생체리듬의 조절, 면역력의 증진, 질병의 예방, 노화억제 등의 신체조절기능을 되찾는 것이라고 할 수 있다(41). 그러나 다른 한편으로는 EGCG는 생물학적 효과와 흡수율도 낮으며, 중성이나 알칼리성 용액에 불안정성을 가지고 있는 제한점이 있다는 연구 보고도 있다(4). 이런 이유로 녹차의 여러 가지 카테킨에 대한 다양한 활용 방법들이 연구되고 있다.

탄나아제에 의해 유리된 갈릭산은 유의적으로 강력한 항산화 효과를 가지며(10), EGCG 한 분자에서 유리된 EGC와 갈릭산의 가수분해물이 증가할수록 더 많은 항산화 효과를 나타내어 탄나아제를 처리한 녹차가 탄나아제를 처리하지 않은 녹차보다 발암물질인 NDMA에 대하여 독성을 억제시키는 효과가 크다는 보고가 있다(9). Hong 등(42)의 연구에서는 최적의 추출 조건(1% 녹차 추출물에 tannase 30 U/mL로 1시간 반응)으로 생성된 녹차 추출물의 ABTS 및 DPPH의 라디칼 소거능에 대한 측정하였는데, ABTS 라디칼에 있어 탄나아제 처리 녹차 추출

물의 IC₅₀은 75.23 µg/mL로 탄나아제 처리하지 않은 녹차 추출물 IC₅₀ 92.39 µg/mL에 비해 유의적으로 낮은 값을 나타내었다. 또한 DPPH 라디칼에 있어서도 역시 탄나아제를 처리한 녹차 추출물의 경우(IC₅₀ 36.65 µg/mL)가 탄나아제로 처리하지 않은 녹차 추출물(IC₅₀ 41.54 µg/mL)보다 유의적으로 낮아 항산화력이 향상됨을 나타내었다(Fig. 5). 탄나아제 처리에 따른 녹차의 항산화력 향상을 보고한 또 다른 연구에 의하면 탄나아제로 처리된 녹차는 동일한 농도(200 µm)에서 탄나아제로 처리되지 않은 녹차에 비해 2배 가량 높은 DPPH 라디칼 소거능(62% vs. 33%)을 나타내었고, 항산화력은 분자 수준에서 볼 때 카테킨들 중에 EGC가 가장 뛰어나고 그 다음으로는 EGCG, ECG, EC 순으로 나타난다고 보고하였다(43). 탄나아제 처리에 의한 이러한 녹차의 라디칼 소거능 향상은 카테킨들의 변화에 의한 결과로 생각되며, 이들의 항산화 능력은 각 폴리페놀의 화학적 구조, 금속 킬레이트에 대한 활성 등이 관련한 결과로 생각되고 있다(44). 따라서 탄나아제 처리에 의한 EGC 증가는 녹차의 항산화력 증가에 기여하는 것으로 생각되고 있다. 또한 Soong과 Barlow(45)은 유리 갈릭산의 증가는 항산화력과 양의 상관관계가 있음을 보고하였으며, 그 외에 다른 많은 연구에서도 탄나아제에 의해 유리된 갈릭산과 EGC는 항산화력을 유의하게 증가시키는 것을 보고하고 있다(8,24,46). 갈릭산은 ABTS나 DPPH 라디칼뿐 아니라 super oxide anions, hydroxyl과 peroxy 라디칼에 대한 소거능이 매우 뛰어나 유리된 갈릭산은 자외선이나 이온 조사에 의해 손상된 세포에 대해 매우 효과적임이 알려져 있다(47). 또 다른 여러 연구에서도 탄나아제로 처리한 녹차가 EGCG보다 항산화 능력이 높다고 하였는데(8), 이러한 효과는 ECG 구조 중에 hydroxyl group의 증가에 의해 항산화 능력이 증가했기 때문이라고 하였다.

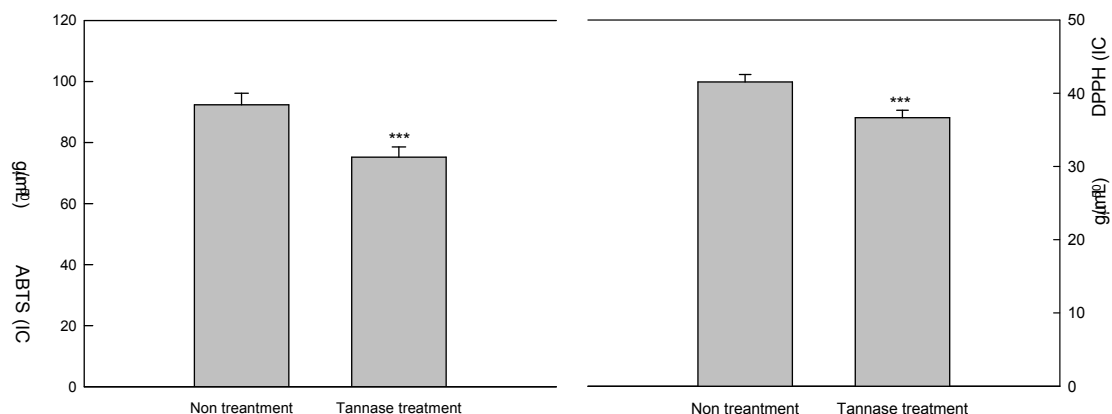


Fig. 5. ABTS and DPPH radicals scavenging activities of green tea extract with or without tannase treatment under optimum reaction conditions. Values are means±SD of triple determinations. The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) is the effective concentration at which ABTS or DPPH radical is scavenged by 50%. ABTS: 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), DPPH: 1, 1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, EC: (-)-epicatechin, ECG: (-)-epicatechin gallate, EGC: (-)-epigallocatechin, EGCG: (-)-epigallocatechin gallate.

탄나아제로 생물전환시킨 녹차의 항염 및 항암 효과
염증은 조직손상과 병원균의 침입으로부터 인체를 방어하는 가장 중요한 기전 중의 하나로, 정상적인 염증 반응은 전구 염증 단백질의 발현을 감소시키고 항염증 단백질의 발현을 증가시키며 초기 면역세포 보충을 촉진시키기 위한 혈관의 변화를 복구하는 등의 조절이 일어난다(48). 그러나 만성 염증 반응은 궁극적으로 만성 피부질환, 류마티스 관절염, 기관지염, 위염, 다발성 경화증, 염증성 장질환 등의 염증 질환으로 발전할 수 있으므로 적절한 치료가 요구된다(49). 대식세포주인 RAW264.7 세포는 항염증 약물의 효능을 검증하고, 전구 염증 매개인자들의 유도를 주도하는 신호전달경로의 억제효능을 가진 약물을 평가하기 위한 실험모델로 가장 일반적으로 사용되고 있다.

Yoshizawa 등(50)은 EGCG가 항염증 작용에 매우 높은 생리활성을 나타낸다고 보고하였으나, Lu와 Chen(43)은 Cu^{2+} 의 존재 하에서 RAW264.7 세포의 생존율을 측정하였는데, 탄나아제로 처리한 녹차와 그렇지 않은 녹차를 비교하였는데, 탄나아제로 처리한 녹차 안에서의 세포생존율은 대조군과 비교하여 유의적으로 높았다. 100 ppm 농도에서, 탄나아제로 처리되지 않은 녹차의 배양된 세포의 생존율은 70%로 탄나아제로 처리한 녹차의 85%보다 낮았다. 이러한 결과는 탄나아제로 처리한 녹차가 Cu^{2+} 의 손상으로부터 막아주어 세포의 생존율을 높여 주는 것으로 보고했다. 게다가 다른 연구자들은 EGCG가 Cu^{2+} 와 결합하여 DNA의 분열을 이끄는데, 이것은 구리와 산화된 카테킨들이 그렇지 않은 카테킨들보다 더 많이 산화스트레스를 촉진하기 때문이라고 하였다(51).

녹차 카테킨의 항암작용은 매우 잘 알려져 있으며(52-54), 특별히 EGCG는 암세포의 분화를 억제시켜주는 가장 강력한 효과가 있음이 보고되고 있다(55). 하지만 또 다른 연구에서는 EGCG가 농도 의존적으로 잠재적인 독성도 가지고 있다고 하였다(56). Macedo 등(46)은 탄나아제로 처리한 녹차와 EGCG도 원래의 녹차가 가지고 있는 좋은 특성이 변하지는 않으며(low genotoxicity, antiproliferative activity, up-regulation of pro-apoptotic genes), 오히려 생리활성 능력은 증가한다고 하였다. 또한 세포독성과 세포분화를 알아보기 위한 MTT와 sulforhodamine B(SRB) 실험에서도 탄나아제로 처리한 녹차와 EGCG에서는 세포독성을 유발하지 않았으며, 인체 대장암 세포주인 HT29와 위선암 세포주인 PG100의 세포분화를 억제하며, EGCG의 독성을 감소시켜준다고 하였다. 게다가 세포사멸(apoptosis)과 관련해서 apoptotic protease activating factor(APAF)1, caspase(CASP)-8, cyclin-dependent kinase inhibitor(CDKN)1A와 FAS의 발현을 통제하

며, 또 다른 한편으로는 세포의 주기를 조절하며, cyclin-dependent kinase(CDK2), CDK4, B-cell lymphoma(bcl) 2, bcl2L1, E2F1 그리고 c-myc를 하향 조절시키는 것을 관찰하였다고 하였다.

탄나아제로 생물전환시킨 녹차 화장품 광보호 효과

오존층의 파괴에 따른 자외선 노출의 증가, 대기오염, 공해물질에 피부 및 신체 부위의 노출이 증가되어 이로부터 신체를 방어하고 건강을 유지해야 하는 현대인들의 건강, 의학적 수요가 크게 증대되고 있다. 자외선에 의해 유발되는 광산화는 피부의 노화 등 여러 문제를 일으키고 있다. 피부가 많은 양의 자외선에 노출되면 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성되고 이로 인한 방어작용으로 몸 안의 항산화제가 감소된다. 활성산소종인 hydroxyl radical(OH^{\bullet}), superoxide radical($\text{O}_2^{\bullet-}$) 등은 반응성이 매우 높아서 피부의 주요 구성물질인 지질, 단백질, 다당류 및 핵산과 반응하여 세포에 손상을 주고 피부 착색과 주름 형성과 같은 피부 노화를 발생시키는 원인이 된다(57). 자외선 B에 의해 생성된 활성산소는 체내 조직에 축적되어 조직을 산화시킴으로써 산화스트레스(oxidative stress)가 형성되고 그 결과 세포막에 지질의 산화를 야기하여 지질과산화물을 생성시킨다. 지질과산화물의 축적은 생체 내에서 다양한 질병을 야기함과 동시에 노화를 촉진시켜 상당한 문제로 야기되고 있다. 이렇듯 자외선에 의한 활성산소의 증가는 지질의 생성과 세포손상에 있어 환원된 글루타치온과 과산화수소 및 과산화지질의 수치는 피부에 주름 등의 상당한 영향을 미친다.

최근에는 피부에 부작용이 나타나는 합성물질보다 사람의 체질적 특성에 맞으며 안전성이 높은 천연성분을 이용한 기능성 화장품 개발이 요구되고 있는데, 식물은 다양한 활성성분을 함유하고 있어 각종 식물 유래의 효능 성분 탐색에 대한 집중적인 연구가 이루어지고 있다. 녹차의 카테킨은 다양한 동물모델에서 화학적 발암성의 각 단계를 억제하며(58), 자외선으로 생성된 피부 종양의 성장을 저해한다(59). 자외선에 의해 유도된 피부 종양을 지닌 SKH-1 마우스에 녹차 추출물을 공급시켰을 때 종양의 억제효과가 있었으며(60), 또한 무모쥐에서 자외선 B를 조사한 피부 조직의 백혈구 침윤, 홍반, 부종 등 염증반응을 억제하며, 피부의 광발암성을 억제시킨다는 보고도 있다(61). 녹차의 성분은 화학물질 및 자외선에 의한 피부암 발생을 억제하며 이는 주로 녹차의 카테킨에 의한 항산화 효과에 기인한다. Katiyar 등(62)은 녹차 추출물을 피부에 전 처리할 경우 자외선에 의해서 발생할 수 있는 홍반을 막을 수 있는데, 이것은 자외선에 의한 홍반이 유발과정 중에 프리 라디칼(free radical)이 관여하고 녹차의 성분은

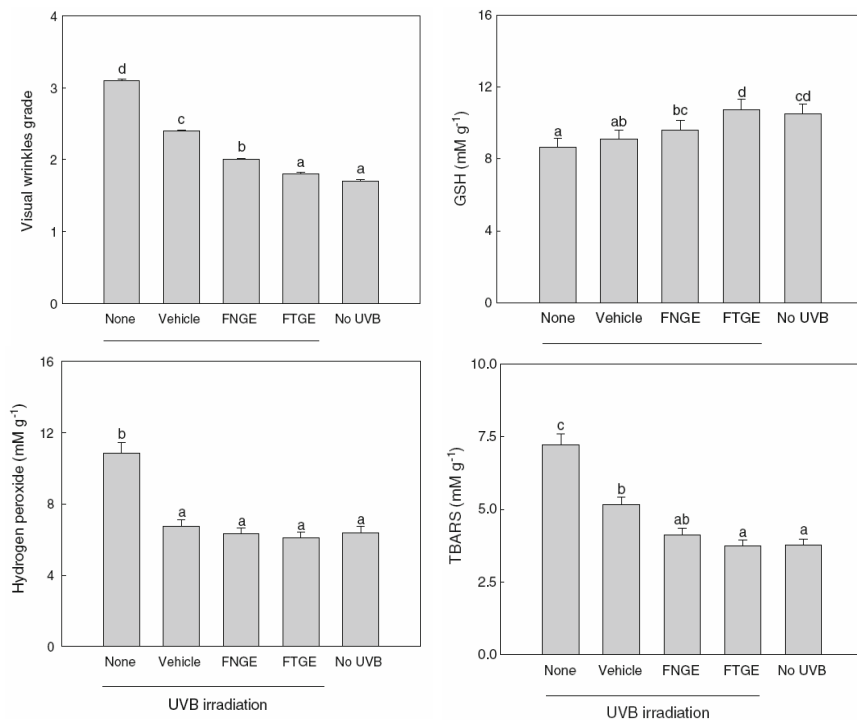


Fig. 6. Effect of formulation containing tannase-converted green tea extract on visual wrinkle grade, the reduced form of glutathione (GSH), hydrogen peroxide levels and lipid peroxidation levels in UVB-irradiated hairless mice. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among samples as determined by Duncan's multiple range test. Bars show the mean \pm SEM for five mice. Vehicle base formulation, FNGE formulation containing 5% normal green tea extract, FTGE formulation containing 5% tannase-converted green tea extract. Thio-barbituric acid-reactive substance (TBARS) content was calculated as a malondialdehyde (MDA) content.

이를 제거할 수 있으며, 이런 능력으로 인해 자외선으로 인한 홍반이나 주름 등이 억제될 수 있을 거라 하였다.

Hong 등(63)은 무모쥐 피부에 자외선 B를 조사시켜 탄나아제를 이용하여 녹차를 가수분해시킨 추출물이 첨가된 화장품을 바른 후 8주 후에 주름에 대한 광노화 효과와 산화스트레스에 대한 효과를 측정하였는데(Fig. 6), 자외선을 조사시킨 후 아무것도 바르지 않은 대조군은 깊은 주름이 생겼으나, 자외선을 조사시킨 후 탄나아제로 처리한 녹차 화장품을 바른 군은 미세한 주름이 생겨 통계적으로 유의적인 차이를 나타내었고, 자외선 무조사군과는 유의적인 차이가 없었다고 하였다. 그리고 탄나아제를 이용하여 녹차가수분해물이 첨가된 화장품을 바른 군의 환원된 글루타치온 효과는 10.73 mM/g으로 자외선 무조사군의 10.15 mM/g 보다 유의적으로 높았고, 과산화수소의 수치는 대조군을 제외하고는 자외선 무조사군과 다른 군들 간의 유의적인 차이가 없었다. 또한 과산화지질의 생성량을 알아보기 위해 malondialdehyde(MDA)의 함량을 측정한 결과는 탄나아제로 처리한 녹차 화장품을 바른 군, 자외선 무조사군 간의 수치 또한 유의적으로 차이가 없었고, 이것으로 탄나아제로 처리하여 생물전환된 녹차가수분해물이 들어있는 화장품을 과산화지질과 산화단백질의 생성을 효과적으로 억제하여 자외선으로 인한 피부의 광노화 현상을 억제할 수 있을 것이라고 하였다.

결론

이러한 연구 결과들을 바탕으로 탄나아제가 녹차의 침

전물 제거와 색이나 향미의 보존으로 녹차의 질을 높이는 데 역할을 하는 것은 물론 항산화 활성과 항염 및 항암을 비롯한 생리활성 효과를 촉진시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀지고 있다. 녹차에 대한 탄나아제 반응 조건의 확립은 차 추출물의 맛 개선과 더불어 다양한 제품 개발 가능성을 확대하며 생리활성이 증가된 고품질, 고효율의 원료 생산을 가능하게 할 수 있다. 이러한 소재의 활용은 고부가가치의 기능성 식품, 화장품, 그리고 의약품으로의 활용도를 높이고 이로 인한 기술 이전 및 산업화를 촉진할 수 있는 기반을 확보할 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

- Goli AH, Barzegar M, Sahari MA. 2005. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia-vera*) hull extracts. *Food Chem* 92: 521-525.
- Wang H, Provan GJ, Helliwell K. 2000. Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. *Trends Food Sci Technol* 11: 152-160.
- Umeda D, Yano S, Yamada K, Tachibana H. 2008. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate signaling pathway through 67-kDa laminin receptor. *J Biol Chem* 283: 3050-3058.
- Zhu Q, Zhang A, Tsang D, Huang Y, Chen Z. 1997. Stability of green tea catechins. *J Agric Food Chem* 45: 4624-4628.
- Furukawa A, Oikawa S, Murata M, Hiraku Y, Kawanishi S. 2003. (-)-Epigallocatechin gallate causes oxidative damage to isolated and cellular DNA. *Biochem Pharmacol* 66: 1769-1778.

6. Bertram B, Bollow U, Rajae-Behbahani N, Burkle A, Schmezer P. 2003. Induction of poly(ADP-ribosylation) and DNA damage in human peripheral lymphocytes after treatment with (-)-epigallocatechin gallate. *Mutat Res* 534: 77-84.
7. Malik A, Azam S, Hadi N, Hadi SM. 2003. DNA degradation by water extract of green tea in the presence of copper ions: implications for anticancer properties. *Phytother Res* 17: 358-363.
8. Battestin V, Macedo GA, De Freitas VAP. 2008. Hydrolysis of epigallocatechin gallate using a tannase from *Paecilomyces variotii*. *Food Chem* 108: 228-233.
9. Lu MJ, Chen C. 2007. Enzymatic tannase treatment of green tea increases *in vitro* inhibitory activity against *N*-nitrosation of dimethylamine. *Process Biochem* 42: 1285-1290.
10. Niho N, Shibutani M, Tamura T, Toyoda K, Uneyama C, Takahashi N, Hirose M. 2001. Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats. *Food Chem Toxicol* 39: 1063-1070.
11. Negi AS, Darokar MP, Chattopadhyay SK, Garg A, Bhat-tacharya AK, Srivastava V, Khanuja PS. 2005. Synthesis of a growth promoter from gallic acid. *Bioorg Med Chem Lett* 15: 1243-1247.
12. Zhu M, Phillipson JD, Greengrass PM, Bowery NE, Cai Y. 1997. Plant polyphenols: biologically active compounds or nonselective binders to protein? *Phytochem* 44: 441-447.
13. Sittig M. 1988. Trimethoprim. In *Pharmaceutical manufacturing encyclopedia*. Sittig M, ed. William Andrew/Noyes, New Jersey, USA. p 282-284.
14. Sharma S, Gupta MN. 2003. Synthesis of antioxidant propyl gallate using tannase from *Aspergillus niger* var Teighem in nonaqueous media. *Bioorg Med Chem Lett* 13: 395-397.
15. Chung US, Oh YY, Seo YM. 2009. A Study on the protective effect of gallic acid in cultured human skin melanoma cells damaged by hydrogen peroxide. *Korean J Soc People Plant Environ* 12: 65-71.
16. Jhoo JW. 2008. Anti-inflammatory effects of purpurogallin carboxylic acid, an oxidation product of gallic acid in fermented tea. *Korean J Food Sci Technol* 40: 707-711.
17. Park WS. 2010. Inhibitory effect of gallic acid on production of chemokine and growth factor in mouse macrophage stimulated by lipopolysaccharide. *Korean J Orient Physiol Pathol* 24: 586-591.
18. Deschamps AM, Lebeault JM. 1984. Production of gallic acid from tara tannins by bacterial strains. *Biotechnol Lett* 6: 237-242.
19. Armstrong GS. 1984. A study of tannin protein interactions. *Dissertation Abstracts International* 44: 2965.
20. Rodriguez H, de las Rivas D, Gonez-Cordoves C, Munoz R. 2008. Degradation of tannic acid by cell-free extracts of *Lactobacillus plantarum*. *Food Chem* 107: 664-670.
21. Liang Y, Lu J, Zhang L. 2002. Comparative study of cream in infusions of black tea and green tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *Int J Food Sci Technol* 37: 627-634.
22. Hatamoto O, Watarai T, Kikuchib M, Mizusawab K, Sekinea H. 1996. Cloning and sequencing of the gene encoding tannase and a structural study of the tannase subunit from *Aspergillus oryzae*. *Gene* 175: 215-221.
23. Iacazio G, Perissol C, Faure B. 2000. A new tannase substrate for spectrophotometric assay. *J Microbiol Methods* 42: 209-214.
24. Lekha PK, Lonsane BK. 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv Appl Microbiol* 44: 215-260.
25. Boadil DK, Neufeld RJ. 2001. Encapsulation of tannase for the hydrolysis of tea tannins. *Enzyme Microbial Tech* 28: 590-595.
26. Lu MJ, Chu SC, Yan L, Chen C. 2009. Effect of tannase treatment on protein tannin aggregation and sensory attributes of green tea infusion. *Food Sci Technol* 42: 338-342.
27. Kim DH, Lee J, Kang BS. 2011. Changes in the quality of green tea concentration through tannase treatment. *Korean J Food Nutr* 24: 720-724.
28. Raghuwanshi S, Misra S, Saxena RK. 2012. Enzymatic treatment of black tea (CTC and Kangra orthodox) using *Penicillium charlesii* tannase to improve the quality of tea. *J Food Process Preserv* 24: 1745-1749.
29. Su E, Xia T, Gao L, Dai Q, Zhang Z. 2009. Immobilization and characterization of tannase and its haze-removing. *Food Sci Technol Int* 15: 545-552.
30. Bhat TK, Singh B, Sharma OP. 1998. Microbial degradation of tannins—a current perspective. *Biodegradation* 9: 343-357.
31. Chun JU. 2010. Rapid measure of color and catechins contents in processed teas using NIRS. *Korean J Plant Res* 23: 386-392.
32. Kang ST, Yoo UH, Nam KH, Kang JY, Oh KS. 2007. Antioxidative effects of green tea extract on the oxidation of anchovy oil. *J Agric Life Sci* 41: 47-53.
33. Obanda M, Owuor PO, Mang'oka R. 2001. Changes in the chemical and sensory quality parameters of black tea due to variations of fermentation time and temperature. *Food Chem* 75: 395-404.
34. Powell C, Clifford MN, Opie SC, Ford MA, Robertson A, Gibson CL. 1993. Tea cream formation: the contribution of black tea phenolic pigments determined by HPLC. *J Sci Food Agric* 63: 77-86.
35. Ravichandran R, Parthiban R. 1998. Changes in enzyme activities (polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase) with type of tea leaf and during black tea manufacture and the effect of enzyme supplementation of dhoor on black tea quality. *Food Chem* 62: 277-281.
36. Peyrat-Maillard MN, Bonnelly S, Rondini L, Berset C. 2001. Effect of vitamin E and vitamin C on the antioxidant activity of malt rootlets extracts. *Lebensm-Wiss u-Technol* 34: 176-182.

37. Liudong F, Feng Z, Daoxing S, Xiufang Q, Xiaolong F, Haipeng L. 2011. Evaluation of antioxidant properties and anti-fatigue effect of green tea polyphenols. *Sci Res Essays* 6: 2624-2629.
38. Fujiki HJ. 1999. Two stages of cancer prevention with green tea. *Cancer Res Clin Oncol* 125: 589-597.
39. Kumamoto M, Sonda T. 1998. Evaluation of the anti-oxidative activity of tea by an oxygen electrode method. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 175-177.
40. Chen ZY, Zhu QY, Wong FY, Zhang Z, Chung HY. 1998. Stabizing effect of ascorbic acid on green tea catechins. *J Agric Food Chem* 46: 2512-2516.
41. Merken HM, Beecher GR. 2000. Measurement of food flavonoids by high-perfor mance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 48: 577-599.
42. Hong YH, Yeon YK, Jung EY, Shin KS, Yu KW, Kim TY, Suh HJ. 2011. Optimal reaction conditions and radical scavenging activities for the bioconversion of green tea using tannase. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1501-1506.
43. Lu MJ, Chen C. 2008. Enzymatic modification by tannase increases the antioxidant activity of green tea. *Food Res Int* 41: 130-137.
44. Ian RR, Joanne ML. 2001. Simulated intestinal digestion of green and black teas. *Food Chem* 73: 481-486.
45. Soong YY, Barlow PJ. 2006. Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. *Food Chem* 97: 524-530.
46. Macedo JA, Gambero A, Macedo GA, Ribeiro ML. 2012. Chemopreventive potential of the tannase-mediated bio-transformation of green tea. *Food Chem* 133: 358-365.
47. Richards J, Adams F. 1987. Study of reaction rates of the antioxidants gallic acid, BHA and BHT using the technique of plus radiolysis. *Int J Food Sci Technol* 22: 501-508.
48. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2: 787-795.
49. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. 2003. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* 24: 25-29.
50. Yoshizawa S, Horiuchi T, Fujiki H, Yosida T, Okuda T, Sugimura T. 1987. Anti tumor promoting activity of (-) epigallocatechin gallate, the main constituent of tannin in green tea. *Phytother Res* 1: 1-14.
51. Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. 2004. Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicol In Vitro* 18: 555-561.
52. Banerjee S, Manna S, Saha P, Panda CK. 2005. Black tea polyphenols suppress cell proliferation and induce apoptosis during benzo-(a)pyreneinduced lung carcinogenesis. *Euro J Cancer Prev* 14: 215-221.
53. Cooper R, Morre DJ, Morre DM. 2005. Medicinal benefits of green tea. II. Review of anticancer properties. *J Altern Complementary Medi* 11: 639-652.
54. Maeta K, Nomuro W, Takatsume Y, Izawa S, Inoue Y. 2006. Green tea polyphenols as prooxidants to active oxidative-stress-responsive transcription factors in yeasts. *Appl Environ Microbiol* 73: 572-580.
55. Shimizu M, Shirakami Y, Moriwaki H. 2008. Targeting receptor tyrosine kinases for chemoprevention by green tea catechins, EGCG. *Int J Mol Sci* 9: 1034-1049.
56. Schmidt M, Schmitz HJ, Baumgart A, Guedon D, Netsch MI, Kreuter MH, Schmidlin CB, Schrenk D. 2005. Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture. *Food Chem Toxicol* 43: 307-314.
57. Yaar M, Gilchrest BA. 2007. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *British J Dermatol* 157: 874-887.
58. Huang MT, Xie JG, Wang ZY, Ho CT, Lou YR, Wang CX, Hard GC, Conney AH. Effects of tea, decaffeinated tea, and caffeine on UVB light-induced complete carcinogenesis in SKH-1 mice: demonstration of caffeine as a biological important constituent of tea. *Cancer Res* 57: 2623-2629.
59. Wang ZY, Huang MT, Ho CT, Chang R, Ma W, Ferraro T, Reuhl KR, Yang CS, Conney AH. 1992. Inhibitory effect of green tea on the growth of established skin papillomas in mice. *Cancer Res* 52: 6657-6665.
60. Wang ZY, Agarwal G, Bicker DR, Mukhtar H. 1991. Protection against ultra B radiation-induced photocarcinogenesis in hairless mice by green tea polyphenols. *Carcinogenesis (Lon.)* 12: 1527-1530.
61. Record IR, Dreosti IE. 1998. Protection by black tea and green tea against UVB and UVA+B induced skin cancer in hairless mice. *Mutat Res* 422: 191-199.
62. Katiyar SK, Matsui MS, Elmetts, CA, Mukhtar H. 1999. Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory responses and infiltration of leukocytes in human skin. *Photochem Photobiol* 69: 148-153.
63. Hong YH, Jung EY, Shin KS, Kim TY, Yu KW, Chang UJ, Suh HJ. 2012. Photoprotective effects of a formulation containing tannase-converted green tea extract against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *Appl Biochem Biotechnol* 166: 165-175.