

Tannase를 이용한 녹차의 생물학적 전환의 최적 조건 마련 및 라디칼 소거능

홍양희¹ · 연유경² · 정은영¹ · 신광순³ · 유광원⁴ · 김태영⁵ · 서형주^{1*}

¹고려대학교 식품영양학과, ²고려대학교 생명환경과학대학원

³경기대학교 식품생물공학과

⁴충주대학교 식품영양학과, ⁵(주)비티씨

Optimal Reaction Conditions and Radical Scavenging Activities for the Bioconversion of Green Tea Using Tannase

Yang-Hee Hong¹, You Kyung Yeon², Eun Young Jung¹, Kwang-Soon Shin³,
Kwang-Won Yu⁴, Tae Young Kim⁵, and Hyung Joo Suh^{1*}

¹Dept. of Food and Nutrition and ²Dept. of Bioscience and Technology, Graduate School of Life and Environmental Science, Korea University, Seoul 136-713, Korea

³Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Gyeonggi 443-760, Korea

⁴Dept. of Food and Nutrition, Chungju National University, Chungbuk 368-701, Korea

⁵Bionic Trading Corporation, Gyeonggi 425-906, Korea

Abstract

In this study, we optimized the reaction conditions for the bioconversion of green tea using tannase, and to evaluate its radical scavenging activities. Tea catechins such as (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) or (-)-epicatechin gallate (ECG) were hydrolyzed by tannase to produce (-)-epigallocatechin (EGC) or (-)-epicatechin (EC), respectively, and a common product, gallic acid. The bioconversion of tea catechins by tannase was increased as enzyme concentration, substrate concentration and incubation time for enzyme dose. The results indicated the optimum reaction conditions for tannase were tannase 30 U/mL (enzyme concentration) on 1% green tea (substrate concentration) for 1 hr (incubation time for enzyme). Tannase enhanced the radical-scavenging properties of green tea; the 2,2-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals scavenging abilities were significantly ($p < 0.001$) greater for the tannase-treated green tea extract compared to the untreated green tea extract. It is reported that ECG has the greatest antioxidant activity among the catechins in green tea, and the release of gallic acid is considered to be beneficial because of its significant antioxidant potency. The results of this study suggest that the tannase-treated green tea increases antioxidant activities under optimum reaction conditions.

Key words: green tea, tannase, catechins, bioconversion, radical scavenging activity

서 론

차는 세계에서 가장 많이 음용되고 있는 음료 중 하나이다. 차나무에서 어린잎을 채취하여 수분 함량을 5% 이하로 건조시킨 다음, 차 잎의 추출 과정에서 산화되는 색상에 따라 백차, 홍차, 녹차 등으로 구분되어 사용되고 있으며 국내에서는 매년 약 250만 톤 규모 이상의 녹차가 재배되고 있다(1). 녹차는 원료의 타입, 재배 방법, 기후 등에 의해 영향을 많이 받는다고 알려져 있으며 특히 녹차에 함유되어 있는 catechins의 양이나 질은 pH, 온도, 효소 처리 등의 추출 조건이나 방법에 따라서 크게 좌우된다고 보고되고 있다(1).

녹차의 catechins는 강력한 항산화제로 녹차의 심장병 예방효과, 항암효과, 항균효과 등 녹차의 다양한 기능성을 설

명하는 주된 성분이다. 녹차의 catechins에는 (-)-epicatechin(EC), (-)-epicatechin gallate(ECG), (-)-epigallocatechin(EGC), (-)-epigallocatechin gallate(EGCG)와 같은 epicatechin 유도체와 catechin이 있다(2). EGCG는 녹차 catechins의 대부분을 차지하며 전체 녹차 내 총 폴리페놀의 약 40%에 해당된다(3). EGCG는 녹차 catechins 중 가장 잘 알려진 활성 물질이지만 EGCG는 생체이용률이 낮고 중성이나 알칼리성 용액에 불안정성하다는 제한점이 있으며(4) 특히 EGCG은 DNA 손상을 야기하며 인체 세포주에서는 염색체이상(chromosome aberration)과 자매염색분체교환(sister chromatid exchanges)을 유도하고(5,6), 동물실험에서 대장암 유발을 강화함이 보고되기도 하였다(7,8). 따라서 녹차의 이용성을 증대시키기 위해서는 녹차의 대부분을 차

*Corresponding author. E-mail: suh1960@korea.ac.kr
Phone: 82-2-940-2853, Fax: 82-2-940-2850

지하고 있는 주요 catechins인 EGCG의 위험성 억제에 대한 연구가 요구되며 이에 EGCG를 보다 안전하고 효과적인 catechins로의 전환을 유도하는 방안이 제안되고 있다.

Tannin acylhydrolase는 곰팡이, 효모나 세균 등에 의해 생산되는 효소로 일반적으로 tannase로 알려져 있다. Tannase는 'ester' 결합이나 'depside' 결합에 작용하는 분해 효소로 녹차의 ECG와 EGCG를 각각 EC와 EGC로 전환하고 gallic acid를 유리시킨다(9). EGC는 항산화력이 가장 뛰어난 catechins로 EGCG에서 유리된 EGC가 증가할수록 항산화 효과는 증가하여 tannase를 처리한 녹차는 tannase를 처리하지 않은 녹차보다 발암 물질인 N-nitrosodimethylamine(NDMA)에 대항하여 독성을 억제시키는 효과가 크다고 보고되고 있다(10). 또한 tannase에 의해 유리된 gallic acid는 항산화력을 유의하게 증가시키기 때문에 매우 유용하게 생각되고 있다(11,12). 이처럼 tannase는 EGCG를 EGC와 gallic acid로 분해함으로써 항산화력을 기반으로 한 생리활성을 향상시키며 EGCG에 대한 위험성을 감소시킬 수 있어 최근 녹차에 tannase 처리 과정의 적용은 새롭게 주목받게 되었다(10).

Tannase는 EGCG를 EGC와 gallic acid로 분해함으로써 홍차음료의 혼탁 방지, 녹차음료의 쓴맛 억제, 맥주의 투명화, 과즙음료의 침전 억제 등 여러 용도로 사용할 수 있다. 특히 일본에서는 녹차음료에서 맛이나 카테킨 함유량 등에 영향을 미치지 않고 쓴맛이나 혼탁을 억제할 수 있기 때문에 여러 상품들에 이용되고 있다. 차에 대한 tannase 반응 조건의 확립은 차 추출물의 맛 개선과 더불어 다양한 제품 개발 가능성을 확대하며 생리활성이 증가된 고품질, 고효율의 원료 생산을 가능하게 한다. 이러한 소재의 활용은 고부가가치의 기능성식품으로의 활용도를 높이고 이로 인한 기술 이전 및 산업화를 촉진할 수 있는 기반을 확보할 수 있을 것으로 생각된다.

이에 tannase 처리에 대한 녹차 추출 과정의 조건 마련이 필요하며 이에 대한 효과 검증이 요구되고 있다. 하지만 녹차 catechins에 대한 대부분의 연구는 EGCG에 집중되어 있으며 tannase에 의한 catechins 전환에 관한 연구나 이에 대한 생리활성에 관한 연구는 많이 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 tannase를 이용하여 녹차의 생물학적 전환에 대한 최적 반응 조건을 확립하고 최적 반응 조건으로 마련된 녹차 추출물에 대해 라디칼 소거능 검증을 통해 항산화력의 향상 정도를 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

본 연구에 사용된 녹차는 중국에서 7월말에 채취한 녹차 생엽을 100°C에서 80초간 증열처리 한 후 평균입자 크기를 3 mm 내외로 마쇄한 분말로 Zhejiang Minghuang Natural

Products Development Co., Ltd.(Beijing, China)에서 공급받아 사용하였으며 *Aspergillus ficuum* 기원의 tannase (tannin acylhydrolase, E.C. 3.1.1.20, 500 U/g)는 Kikkoman Co.(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 녹차의 catechins 분석을 위한 EC, ECG, EGC, EGCG, catechin, gallic acid의 표준물질은 Sigma Chemical(St. Louis, MO, USA)에서, 라디칼 소거능 측정을 위한 시약으로 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) 및 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)은 각각 Fluka(Steinheim, Germany)와 Sigma Chemical로부터 구입하여 사용하였고 그 밖의 모든 시약은 분석에 용이한 특급 시약을 사용하였다.

녹차 추출물 제조

녹차 분말을 증류수 100 mL에 현탁시킨 후 0.1 N HCl을 이용해 pH 5.5로 조정하고 tannase를 첨가하여 40°C의 항온수조에서 반응 후 5분간 가열처리로 효소 활성을 제거하여 각 녹차 분말 농도별(기질 농도 0~5%), tannase 농도별(효소 농도 0~50 U/mL), tannase 반응 시간별(효소 반응 시간 0~8 hr)로 녹차 추출물을 획득하여 본 연구의 분석 시료로 사용하였다.

Catechins 분석

녹차의 catechins 분석을 위해 high-performance liquid chromatography(HPLC, Varian 230, Varian Inc., Tucson, AZ, USA)와 분석 칼럼으로 hypersil C18 column(5 µm, 250×4.6 mm ID)을 사용하였고 주입량은 20 µL, 유속은 0.8 mL/min, 칼럼 온도는 37°C, 자외선 검출기 흡광도는 280 nm로 설정하여 분석하였으며 이동상 용매는 1% acetic acid와 100% acetonitrile을 사용하였다. 분석된 catechins로 EC 및 EGC의 전환율은 Cao와 Ito(13)의 방법을 이용하여 계산하였다.

라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능은 Re 등(14)의 방법을 이용하여 7 mM 2.45 mM potassium persulfate를 첨가하여 암소에서 12~16시간 방치한 후 414 nm에서 흡광도가 1.4~1.5가 되도록 증류수로 희석시킨 ABTS 라디칼 용액 250 µL에 시료 12.5 µL을 60분간 반응시킨 후 414 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능 측정은 Cheung 등(15)의 방법을 이용하여 DPPH를 ethanol에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 0.4 mL와 시료 0.1 mL을 10분간 반응시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. Half maximal inhibitory concentration(IC₅₀)은 라디칼을 50% 저하시키는 시료의 농도로 하였다.

통계분석

자료 처리는 SPSS program(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 각 항목에 대한 평균(mean) 및 표준편차(standard deviation, SD)를 산출하였고 시료내의 측정값들의 차이는 p=0.05 수준에서 one-way ANOVA와 구체적

인 사후 검정은 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

Tannase를 이용한 최적의 녹차 추출 조건

Tannase 처리 시간: 녹차 추출물(1%)에 tannase(50 U/mL) 처리 시간(0~8 hr)에 따른 catechins 및 gallic acid 함유량과 EC 및 EGC 전환율은 Fig. 1에 나타내었다. Tannase 처리 전(0 hr)에는 ECG와 EGCG가 각각 311.64, 1846.75 µg/mL 함유되어 있었으나 tannase에 의해 gallic acid와의 결합이 끊어지면서 tannase 처리 0.5시간째에는 ECG가 9.13 µg/mL로 35배가량, EGCG가 19.78 µg/mL로 90배가량 감소되었다. 이와 반비례적으로 EC와 EGC의 함량은 증가되어 tannase 처리 전에는 각각 234.14, 441.91 µg/mL이었으나 tannase 처리 0.5시간째에는 각각 431.39, 1406.19 µg/mL로 함량이 증가되었다. 또한 tannase 처리 1시간째에는 더욱 증가되어 EC와 EGC는 각각 528.00, 1655.22 µg/mL의 높은 함량을 나타내었으나 tannase 처리 1시간 이후부터는 EC와 EGC의 함량에 큰 변화가 없었다. 또한 유리 gallic acid의

수준도 tannase 처리 전(30.63 µg/mL)에 비해 tannase 처리 0.5시간째(915.70 µg/mL)에 30배가량 높은 증가를 나타내었고 1시간째에는 950.05 µg/mL로 약간 상승되었으나 1시간 이후에는 큰 변화를 보이지 않았다. Tannase 처리 시간에 따른 EC 및 EGC 전환율은 tannase 처리 0.5시간째 이미 각각 318.20, 138.25%로 높은 수준을 나타내었고 1시간째에는 더욱 증가되어 374.56, 225.52%로 유의적으로 높아졌으며($p < 0.05$) 1시간 이후에는 역시 통계적으로 유의적인 변화를 나타내지 않았다(Fig. 1).

본 연구 결과 tannase(50 U/mL)의 처리 시간은 0.5시간 내에 대부분 이루어지며 1시간까지도 일부 작용이 이루어지나 1시간 이후부터는 생성물이나 catechins의 전환율에 변화가 거의 없는 것으로 보아 모든 반응은 1시간 이전에 이루어지는 것으로 생각된다. Thomas와 Murtagh(16)는 효소 및 기질의 농도에 따라 차이가 있을 수 있으나 tannase에 의한 가수분해는 일반적으로 20분 안에 대부분 이루어진다고 하였다. Hong(17)은 tannase에 의한 녹차의 생물학적 전환을 시도한 연구에서 1% 녹차 추출물에 대해 tannase(50 U/mL)에 의한 생물학적 전환은 20분 안에 많은 부분이 빠르게 이루어지며 30분에는 대부분의 반응이 종결되었다고 보고하였다. 본 연구에서도 1% 녹차 추출물에 대해 tannase(50 U/mL)에 의한 반응은 0.5시간 즉, 30분 이내에 대부분 이루어지는 것으로 나타났으나 최적의 추출물 획득을 위해 일부 잔존 반응의 종결에 따른 약간의 시간이 요구되어 1시간까지 충분히 반응을 유도하는 것이 바람직한 것으로 판단하고 녹차 추출물에 대한 tannase(50 U/mL)의 반응시간을 1시간으로 결정하였다.

Tannase 기질 농도: Tannase 작용에 대한 기질이 최적 농도를 알아보기 위해 녹차 분말 0.5~5.0%로 다양한 농도로 하여 제조한 녹차 추출물에서의 tannase의 작용(50 U/mL)에 따른 catechins 및 gallic acid의 함유량과 catechins의 전환율을 분석하였다(Fig. 2). 그 결과 EC 및 EGC 전환율은 기질 농도가 높을수록 낮아졌는데 특히 기질 농도가 2% 이상의 경우는 기질 농도 0.5%나 1%에 비해 유의하게 낮아졌으며($p < 0.05$) tannase의 처리 1시간을 기준으로 하여 볼 때 기질 농도 5%에서는 EC 및 EGC 전환율은 각각 91.70, 104.32%로 기질 농도 1%에서의 EC 및 EGC 전환율 231.00%, 360.81%의 절반에도 못 미치는 수준이었다.

일반적으로 기질의 농도가 증가할수록 기질 분자와 효소 분자가 서로 충돌할 수 있는 확률이 높아져 전체 반응속도가 높아진다. 그러나 일정 기질 농도 이상부터는 효소의 제한으로 인해 반응 속도가 증가되지 않으며 특히 기질에 의한 생성물에 의한 저해를 받을 수 있다(18). Pyrogallols, gallaldehyde 및 gallic acid는 경쟁적으로 tannase의 작용을 저해한다고 보고되고 있다(19). 또한 기질의 농도 증가 자체가 효소 활성을 감소시키는 것으로 알려져 있는데 이러한 최대 효소 활성을 고려한 낮은 기질 수준의 적용은 식품산업에서 유용

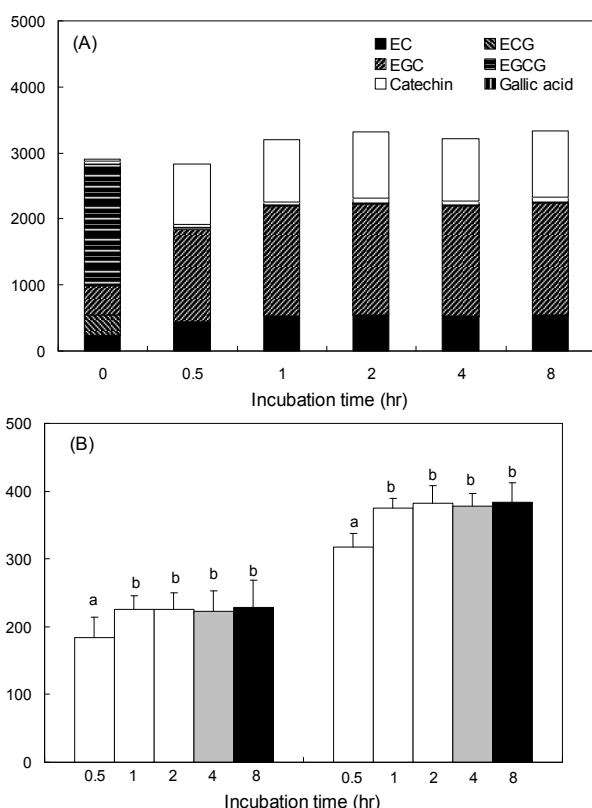


Fig. 1. (A) Contents of catechins & gallic acid and (B) EC & EGC conversion ratio in green tea extract according to the incubation time of tannase treatment (0~8 hr). Bars are means \pm SD of triple determinations. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among samples by Duncan's multiple range test. EC: (-)-epicatechin, EGC: (-)-epicatechin gallate, ECG: (-)-epigallocatechin, EGCG: (-)-epigallocatechin gallate.

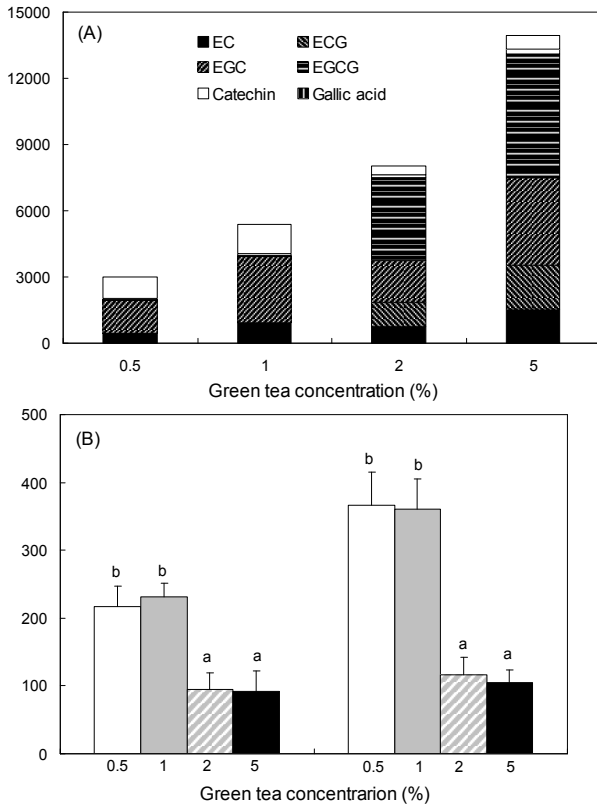


Fig. 2. (A) Contents of catechins & gallic acid and (B) EC & EGC conversion ratio in green tea extract according to green tea concentration (0.5~5.0%). Bars are means \pm SD of triple determinations. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among samples by Duncan's multiple range test. EC: (-)-epicatechin, ECG: (-)-epicatechin gallate, EGC: (-)-epigallocatechin, EGCG: (-)-epigallocatechin gallate.

하게 활용되고 있다(20). 본 연구에서는 기질 농도 1% 이상의 경우에서는 EC 및 EGC 전환율이 오히려 낮아졌다. Tannase 처리에 대해 녹차 기질의 농도를 1%로 설정된 기존 연구들(10,18)과 같이 본 연구에서는 tannase 작용을 위한 기질 농도는 EC 및 EGC 전환율을 고려할 때 1%가 적당한 것으로 판단되었다.

Tannase 반응 농도: 녹차 추출물(1%)에 tannase를 다양한 농도(0~50 U/mL)로 반응시킨 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Tannase의 농도가 높을수록 ECG와 EGCG는 감소되었는데 특히 tannase 농도 30 U/mL에서는 급격한 감소를 나타내어 20 U/mL에서의 tannase 1시간 처리를 기준으로 볼 때 ECG(1802.40 $\mu\text{g/mL}$)와 EGCG(163.23 $\mu\text{g/mL}$)에 비해 30 U/mL에서는 매우 낮은 수준의 ECG(356.15 $\mu\text{g/mL}$)와 EGCG(16.47 $\mu\text{g/mL}$)를 나타내었다. 또 tannase 농도가 높을수록 ECG와 EGCG의 감소에 비례하여 EC, EGC 및 gallic acid는 증가되었으며 역시 tannase 30 U/mL에서는 급격한 증가를 나타내어 tannase 1시간 처리에서 EC, EGC 및 gallic acid의 함량이 각각 905.28, 2677.89, 1251.85 $\mu\text{g/mL}$ 로 tannase 20 U/mL에서의 각각 760.84, 1887.04, 947.06 $\mu\text{g/mL}$ 에 비해 매우 높은 값을 나타내었다. 또한 tannase 농도가 높을수록

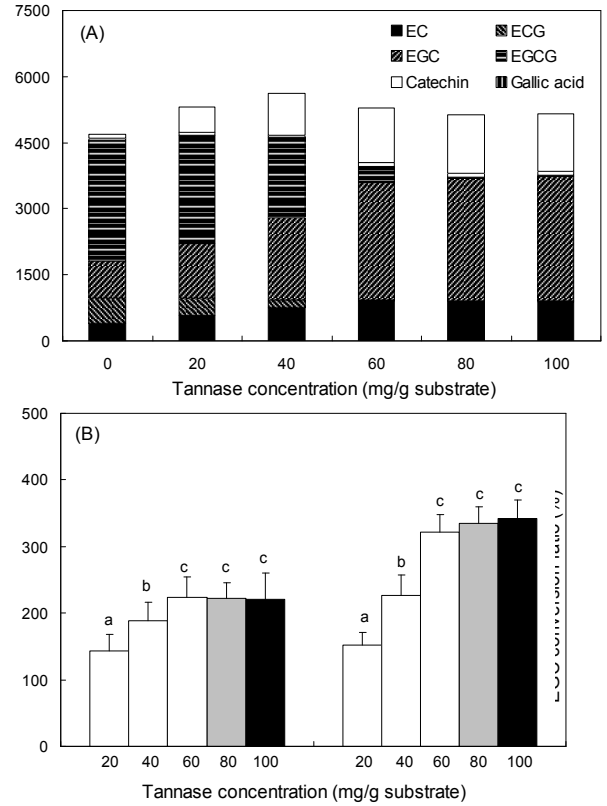


Fig. 3. (A) Contents of catechins & gallic acid and (B) EC & EGC conversion ratio in green tea extract according to tannase concentration (0~100 mg/g). Bars are means \pm SD of triple determinations. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among samples by Duncan's multiple range test. EC: (-)-epicatechin, ECG: (-)-epicatechin gallate, EGC: (-)-epigallocatechin, EGCG: (-)-epigallocatechin gallate.

EC와 EGC 전환율이 높아졌는데 tannase 1시간 처리에서 EC와 EGC 전환율은 tannase 10 U/mL 처리에서는 각각 142.89, 151.33%이었는데 비해 tannase 20 U/mL에서는 각각 188.45, 227.08%로 유의하게 높았다($p < 0.05$). 이러한 EC와 EGC 전환율은 tannase의 30 U/mL에서는 더욱 증가되어 각각 224.23, 322.24%로 tannase 처리 전(0 U/mL)에 비해 유의적으로 높아졌으며($p < 0.05$) tannase 30 U/mL 이상부터는 더 이상 증가를 보이지 않았다. 본 연구의 결과 tannase 농도가 증가함에 따라 EC, EGC 및 gallic acid는 증가되었으며 일정 농도(30 U/mL)에서 급격한 증가를 나타내고 이 농도부터는 EC와 EGC 전환율이 증가하지 않는 것으로 보아 기질 농도 대비 tannase의 적정 반응 농도는 30 U/mL으로 판단되었다.

Tannase를 이용한 최적의 녹차 추출물의 라디칼 소거능 최적의 추출 조건(1% 녹차 추출물에 tannase 30 U/mL로 1시간 반응)으로 생성된 녹차 추출물의 catechins 및 gallic acid 함량에 대한 크로마토그램을 Fig. 4에 나타내었으며 이들의 ABTS 및 DPPH의 라디칼 소거능에 대한 측정 결과는 Table 1에 나타내었다. ABTS 라디칼에 있어 tannase 처리 전후의 녹차 추출물은 모두 높은 라디칼 소거능을 나타내어

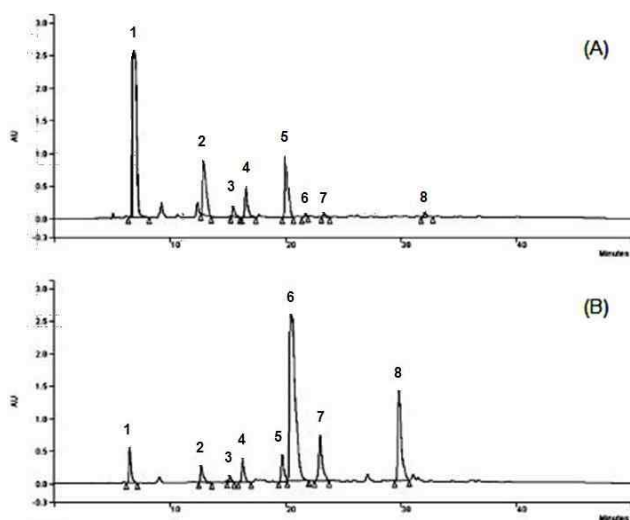


Fig. 4. High-performance liquid chromatography (HPLC) chromatogram for catechins and gallic acid in green tea extract (A) with or (B) without tannase treatment under optimum reaction conditions. 1: GA, gallic acid, 2: EGC, (-)-epigallocatechin, 3: catechin, 4: caffeine, 5: EC, (-)-epicatechin, 6: EGCG, (-)-epigallocatechin gallate, 7: GCG, (-)-gallocatechin gallate, 8: ECG, (-)-epicatechin gallate.

Table 1. ABTS and DPPH radicals scavenging activities of green tea extract with or without tannase treatment under optimum reaction conditions

IC ₅₀ (μg/mL)	Tannase treatment		p value
	Non-treatment	Tannase treatment	
ABTS radical	92.39±3.76	75.23±3.34	<0.001
DPPH radical	41.54±1.02	36.65±1.03	<0.001

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-picrylhydrazyl, EC: (-)-epicatechin, ECG: (-)-epicatechin gallate, EGC: (-)-epigallocatechin, EGCG: (-)-epigallocatechin gallate.

100 μg/mL에서 50% 이상의 ABTS 라디칼 소거능을 나타내었는데(17) 특히 최적 조건에서 형성된 tannase 처리 녹차 추출물의 IC₅₀은 75.23 μg/mL로 tannase 처리 전 녹차 추출물 IC₅₀ 92.39 μg/mL에 비해 유의적으로 낮은 값을 나타내었다(p<0.001). 또한 DPPH 라디칼에 있어서는 두 녹차 추출물 모두 동일한 농도에서 ABTS 라디칼에 보다 높은 소거능을 나타내었으며 80 μg/mL에서 80% 이상의 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었으며 역시 tannase를 처리한 녹차 추출물의 경우 100 μg/mL에서 90% 이상의 높은 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었고(17) IC₅₀도 36.65 μg/mL로 tannase 처리 전 IC₅₀ 41.54 μg/mL보다 유의적으로 낮아(p<0.001) 항산화력이 향상됨을 나타내었다.

ABTS나 DPPH는 전형적으로 항산화력에 대한 라디칼 소거능을 측정하기 위한 기질로 사용되고 있다(21). Tannase 처리에 따른 녹차의 항산화력 향상을 보고한 연구에 의하면

tannase로 처리된 녹차는 동일한 농도(200 μm)에서 tannase로 처리되지 않은 녹차에 비해 2배가량 높은 DPPH 라디칼 소거능(33% vs. 62%)을 나타내었다고 한다(22). Tannase 처리에 의한 이러한 녹차의 라디칼 소거능 향상은 catechins의 변화에 의한 결과로 생각되고 있다. 항산화력은 분자 수준에서 볼 때 catechins 중에 EGC가 가장 뛰어나고 그 다음으로는 EGCG, ECG, EC 순으로 보고되고 있으며 이들의 항산화능력은 각 폴리페놀의 화학적 구조, 금속 킬레이트에 대한 활성 등이 관여한 결과로 생각되고 있다(23). 따라서 tannase 처리에 의한 EGC 증가는 tannase 처리 녹차의 항산화력 증가에 기여하는 것으로 생각되고 있다. 또한 이러한 경향은 tannase 처리된 녹차에 유리 gallic acid의 증가로 설명되는데 Soong과 Barlow(24)은 유리 gallic acid의 증가는 항산화력과 양의 상관관계가 있음을 보고하였으며 그 외에 다른 많은 연구에서도 tannase에 의해 유리된 gallic acid는 항산화력을 유의하게 증가시킴을 보고하고 있다(25,26). Gallic acid는 ABTS나 DPPH 라디칼뿐 아니라 superoxide anions, hydroxyl, peroxy 라디칼에 대한 소거능이 매우 뛰어나 유리된 gallic acid는 UV이나 이온 조사에 의해 손상된 세포에 대해 매우 효과적임이 알려져 있다(27). 따라서 본 연구에서 tannase 처리한 녹차 추출물의 라디칼 소거능 향상은 tannase의 의한 생물학적 전환에 기인한 결과로 사료된다.

요 약

본 연구는 tannase를 이용하여 녹차의 생물학적 전환에 대한 최적 추출 조건을 확립하고 최적 추출 조건으로 마련된 녹차 추출물에 대해 라디칼 소거능 검증을 통해 항산화력의 향상 정도를 평가하고자 하였다. 그 결과 tannase의 반응은 0.5시간 내에 대부분 이루어지며 처리 1시간까지도 일부 작용이 이루어져 최적 추출물을 획득하기 위한 tannase의 반응 시간을 1시간으로 결정하였다. 기질 농도 1% 이상의 경우에는 EC 및 EGC 전환율이 오히려 낮아져 tannase 작용을 위한 기질 농도는 1%가 적당한 것으로 판단되었다. 또한 tannase 농도가 증가함에 따라 EC, EGC 및 gallic acid는 증가되었으며 일정 농도(30 U/mL)에서 급격한 증가를 나타내었고, 이 농도부터는 통계적으로 EC와 EGC 전환율이 증가하지 않는 것으로 보아 tannase의 적정 반응 농도는 30 U/mL으로 판단되었다. 위의 조건으로 마련된 최적의 tannase 처리 녹차 추출물의 라디칼 소거능은 tannase 처리 전 녹차 추출물에 비해 ABTS와 DPPH 라디칼에 있어 모두 유의하게 소거능이 증가되는 것으로 나타나 tannase 처리 최적 추출 조건에 의해 녹차의 항산화력이 향상됨을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 식품기술개발사업에 의해 이

루어진 것임.

문헌

- 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, utilization and analysis. *Trends Food Sci Technol* 11: 152-160.
- Stoner GD, Mukhtar H. 1995. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J Cell Biochem Suppl* 22: 169-180.
- 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.
- Oikawa S, Kawanishi S. 1998. Distinct mechanisms of site-specific DNA damage induced by endogenous reductants in the presence of iron (III) and copper (II). *Biochim Biophys Acta* 1399: 19-30.
- Bertram B, Bollow U, Rajaei-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.
- 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.
- García-Conesa MT, Ostergaard P, Kauppinen S, Williamson G. 2001. Hydrolysis of diethyl diferulates by a tannase from *Aspergillus oryzae*. *Carbohydr Polym* 44: 319-324.
- 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.
- Lekha PK, Lonsane BK. 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv Appl Microbiol* 44: 216-260.
- 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.
- Cao X, Ito Y. 2004. Preparation and purification of epigallocatechin by high-speed countercurrent chromatography (HSCCC). *J Liq Chromatogr RT* 27: 145-152.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med* 26: 1231-1237.
- Cheung LM, Cheung PCK, Ooi VEC. 2003. Antioxidant activity and total polyphenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem* 81: 249-255.
- Thomas RL, Murtagh K. 1985. Characterization of tannase activity on tea extracts. *J Food Sci* 50: 1126-1129.
- Hong YH. 2010. Development of cosmeceuticals using the enzymatic conversion of green tea extracts: focusing on anti-oxidant, anti-wrinkles and whitening effects. *PhD Dissertation*. Donduk Women's University, Seoul, Korea. p 90-123.
- Mohapatra PKD, Mondal KC, Pati BR. 2007. Production of tannase by the immobilized cells of *Bacillus licheniformis* KBR6 in Ca-alginate beads. *J Appl Microbiol* 102: 1462-467.
- Mahadevan A, Sivaswamy SN. 1985. Tannins and microorganisms. In *Frontiers in Applied Microbiology*. Mukerji KG, Pathak NC, Singh VP, eds. Rastogi and Company, Meerut, India. p 327-347.
- Sabu A, Kiran GS, Pandey A. 2005. Purification of tannin acyl hydrolase from *A. niger*. *Food Technol Biotechnol* 43: 133-138.
- Oyaizu M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 44: 307-315.
- Lu MJ, Chen C. 2008. Enzymatic modification by tannase increases the antioxidant activity of green tea. *Food Res Int* 41: 130-137.
- Ian RR, Joanne ML. 2001. Simulated intestinal digestion of green and black teas. *Food Chem* 73: 481-486.
- 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.
- Lekha PK, Lonsane BK. 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv Appl Microbiol* 44: 215-260.
- 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.
- 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.

(2011년 7월 12일 접수; 2011년 10월 20일 채택)