

## 한국산 녹차로부터 분리한 축합형 탄닌의 tyrosinase 저해효과

김진구 · 차원섭 · 박준희 · 오상룡 · 조영제 · 천성숙\* · 최 청\*  
상주산업대학교 식품공학과, \*영남대학교 식품가공학과

### Inhibition Effect against Tyrosinase of Condensed Tannins from Korean Green Tea

Jin-Ku Kim, Woen-Seup Cha, Joon-Hee Park, Sang-Lyong Oh,  
Young-Je Cho, Sung-Sook Chun\* and Cheong Choi\*

Department of Food Engineering, Sangju National Polytechnic University

\*Department of Food Science and Technology, Yeungnam University

#### Abstract

For the utilizing of tannins in the functional foods and natural inhibitor against browning reaction by tyrosinase in foods, inhibition effect against tyrosinase of tannins from Korean green tea was determined. Acetone extract from Korean green tea showed inhibition effect against tyrosinase. The gallocatechin compounds showed higher inhibition effect than the catechin compounds. In terms of stereo isomers, (-)-epicatechin compounds had higher inhibition effect than the (+)-catechin compounds. The monomer had higher inhibition effect than the dimer.

Key words: tyrosinase, inhibitor, condensed tannin, green tea

#### 서 론

차나무 잎에는 카페인과 polyphenol이 많이 들어 있어 여러가지 생리활성과 관련되는 것으로 알려져 일반식물 잎에 비해 특이하다<sup>(1,7)</sup>. 탄닌은 polyphenol을 총칭하는 것으로 탄닌 유래의 화합물과 단백질과의 결합은 탄닌의 hydroxyl기와 단백질의 활성부위와의 공유결합에 의한 반응으로 고도의 소수성 아미노산 잔기와의 소수성 결합과 수소결합을 포함하는 2단계 기작에 의해 탄닌 복합체의 침전물을 형성한다<sup>(8)</sup>. Phenol성 물질 중 flavan-3-ol을 기본골격으로 하는 축합형 탄닌의 성상은 가장 최근에 알려 졌는데 그 중에서도 탄닌의 특징인 단백질 및 금속 이온과의 결합에 관해서는 그응용을 포함해서 연구가 진행되어 왔고 효소활성의 저해작용도 중요한 탄닌의 역할로 인식되어지고 있으며<sup>(12)</sup>, 식물체에서 분리한 phenol 화합물이 각종 세균, 효모의 생육억제 활성 및 효소 저해활성이 있음을 보고하였다<sup>(9,10)</sup>. Tyrosinase는 tyrosine으로부터

3,4-dihydroxy phenylalanine (DOPA)와 DOPA quinone을 거쳐 최종적으로 흑갈색의 melanin 색소생성에 관여하는 효소이며, 야채나 과일류 특히 감자의 갈변현상을 일으키는 효소이다. 또한 피부에 암갈색의 색소 물질을 침착시키는 원인이 되기도 한다. 중국고전 外台秘要, 本草綱目 등에는 한약재가 얼굴의 흑색을 개선한다고 기술하고있다<sup>(11,12)</sup>. 이것을 근거로 최근 Yagi 등<sup>(13)</sup>은 중국 한방 제재에서 tyrosinase 저해제를 연구하였고, 지금까지 천연물에서 추출한 tyrosinase 저해제로서는 aloesin, hinokitol, quercetin 등이 알려져있고 hinokitol은 이미 화장품공업에도 이용되고 있다. 현재 생리활성 물질로서 주목되고 있는 polyphenol은 녹차에도 상당량 함유되어 있으며 그중 flavan-3-ol을 기본골격으로 하는 축합형 탄닌의 tyrosinase 저해효과는 연구된 것이 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 혈압강하<sup>(3,4)</sup>, 질소대사개선<sup>(5,6)</sup>, 항산화제 등<sup>(7)</sup>의 효과가 인정되어 왔으며 우리 고유의 전통차로 이용되고 있는 한국산 녹차로부터 천연 효소저해물질 탐색 연구의 일환으로 탄닌을 분리하고 tyrosinase 저해 효과를 검토함으로써 새로운 기능성 식품 또는 tyrosinase에 의해 발생하는 식품의 갈변현상을

Corresponding author: Young-Je Cho, Department of Food Engineering, Sangju National Polytechnic University, Sangju, Kyungbook 742-170, Korea

막기 위한 천연 효소저해제의 개발을 시도 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험 재료는 제주도 지방에서 재배되어 국내 차 제조업체에서 제조되어 시중에 판매되는 건조 녹차 중 秋茶(뒤음차)를 시중에서 구입하여 공시재료로 사용하였고, 사용된 기기는 Spectrophotometer (LKB, Sweden), 사용된 시약은 Sephadex LH-20 (Pharmacia, Co. Sweden), tyrosinase, DOPA (Sigma co. U.S.A) 등 이고 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

### 녹차로부터 아세톤 추출물의 분리

녹차 3.5 kg에 60% acetone을 가하여 실온에서 24시간 추출한 후 원심분리(5000×g, 30 min)하여 상징액과 침전물을 얻었고, 이 침전물에 다시 60% acetone을 가하여 위와 같은 추출과정을 4회 반복하였다. 각각의 상징액을 모아 농축, 여과하여 chlorophyll을 제거하고 rotary evaporator로 농축한 후 acetone 추출물로서 분획을 위한 시료로 사용하였다.

### 탄닌 화합물의 정제 및 동정

Liphophilic-Sephadex LH-20 column (7×100 cm)과 MCI-gel CHP 20P column (3×50 cm)을 이용하여 농축 시료를 column부피의 1/20가량 주입하고 normal phase type으로서 EtOH을 100%→0%까지 및 reverse phase type으로 MeOH을 0%→100%까지 gradient로 column의 5배 부피의 용매를 Fig. 1과 같이 용출하여 6 가지 순수한 탄닌을 분리하였으며, 분리된 탄닌은 IR (PERKIN-ELMER IR-1330, U.S.A)은 KBr 정제법으로, <sup>1</sup>H-NMR (BRUKER AM-300, Japan)은 TMS [Tetramethylsilane; (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Si]를 기준 물질로 하여 측정 용매 CDCl<sub>3</sub>+DMSO-D<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O를 이용하여 측정하였으며, MS (JEOL JMX-DX 300, Japan)는 negative ion FAB-Mass system에 의해 분자량을 측정하였다. 분석 결과

A: Fraction I에서 분리된 것으로 무색의 침상형 결정체 mp; 172~175°C,  $[\alpha]_D^{25}$ ; +9.4° (C=1.0, acetone)  
IR  $V_{max}$  cm<sup>-1</sup>; 3440 (OH), 1620 (arom, C=C)  
FAB-MS m/z; 289[M-H], C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>; C=62.06%, H=4.86%, O=33.70%  
<sup>1</sup>H-NMR δ; 2.55 (1 H, dd, J=16, 8 Hz, 4-H), 2.91 (1 H, dd, J=16, 6 Hz, 4-H), 4.01 (1 H, s, 3-H), 4.59 (1 H, d, J=8 Hz, 2-H), 5.95, 6.04 (each 1 H, d, J=2,

6 Hz, 8-H), 6.75~6.94 (3 H, m, B-ring H)  
B: Fraction I과 II에서 분리하였으며 무색침상형(H<sub>2</sub>O) mp; 266~269°C,  $[\alpha]_D^{25}$ ; -190.20° (C=1.0, acetone)  
IR  $V_{max}$  cm<sup>-1</sup>; 3440 (OH), 1660 (COO), 1610 (C=C)  
FAB-MS m/z; 441 [M-H], C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>10</sub>; C=58.63%, H=4.17%, O=37.20%  
<sup>1</sup>H-NMR δ; 2.88 (1 H, dd, J=18, 3 Hz, 4-H), 3.10 (1 H, dd, J=18, 4 Hz, 4-H), 4.99 (1 H, brs, 3-H), 5.47 (1 H, s, 2-H), 5.96, 6.03 (each 1 H, d, J=2 Hz, 6,8-H), 6.75~7.03 (3 H, B-ring H), 6.98 (2 H, s, G-H)  
C: Fraction II에서 분리 하였으며 무색 침상형(H<sub>2</sub>O) mp; 224~227°C,  $[\alpha]_D^{23}$ ; -183.7° (C=1.0, acetone)  
IR  $V_{max}$  cm<sup>-1</sup>; 3360 (OH), 1693 (COO), 1600 (arom, C=C)  
FAB-MS m/z; 457[M-H], C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>11</sub>; C=57.94%, H=3.73%, O=38.33%  
<sup>1</sup>H-NMR δ; 2.90 (1 H, dd, J=18, 3 Hz, 4-H), 3.10 (1 H, dd, J=18, 4 Hz, 4-H), 4.93 (1 H, brs, 3-H), 5.43 (1 H, s, 2-H), 5.94, 6.01 (each 1 H, d, 6,8-H), 6.54 (2 H, s, 2',6'-H), 6.98 (2 H, s, G-H)  
D: Fraction III에서 분리하였으며 무색침상형(H<sub>2</sub>O) mp; 186~189°C,  $[\alpha]_D^{23}$ ; +2.4° (C=1.0, acetone)  
FAB-MS m/z; 305[M-H], C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>; C=59.22%, H=4.88%, O=35.90%  
<sup>1</sup>H-NMR δ; 2.56 (1 H, dd, J=16, 8 Hz, 4-H), 2.75 (1 H, dd, J=16, 6 Hz, 4-H), 4.13 (1 H, s, 3-H), 4.74 (1 H, d, J=6 Hz, 2-H), 5.86, 5.99 (each 1 H, d, J=2 Hz, 6,8-H), 6.52 (2 H, s, 2',6'-H)  
E: Fraction III에서 분리 하였으며 무색침상형(H<sub>2</sub>O) mp; 217~219°C,  $[\alpha]_D^{23}$ ; -46.8° (C=1.0, acetone)  
FAB-MS m/z; 305[M-H], C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>; C=56.92%, H=5.14%, O=37.94%  
<sup>1</sup>H-NMR δ; 2.56 (1 H, dd, J=16, 3 Hz, 4-H), 2.70 (1 H, dd, J=16, 4 Hz, 4-H), 4.12 (1 H, s, 3-H), 4.73 (1 H, brs, 2-H), 5.87, 5.98 (each 1 H, d, J=2 Hz, 6, 8-H), 6.51 (2 H, s, 2',6'-H)  
F: Fraction IV로 분리되었으며 주황색의 무정형 분말  $[\alpha]_D^{21}$ ; -216.1° (C=0.98, acetone)  
IR  $V_{max}$  cm<sup>-1</sup>; 1710 (COO), 1600 (C=C)  
FAB-MS m/z; 729[M-H], C<sub>37</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>; C=61.74%, H=4.21%, O=34.05%  
<sup>1</sup>H-NMR δ; 2.55~2.57 (2 H, m, 4'-H), 3.25~3.76 (2 H, m, 3,3'-H), 4.55 (1 H, brs, 4-H), 4.98~5.00 (2 H, m, 2,2'-H), 6.24~6.48 (3 H in total, m, A,A'-ring H),

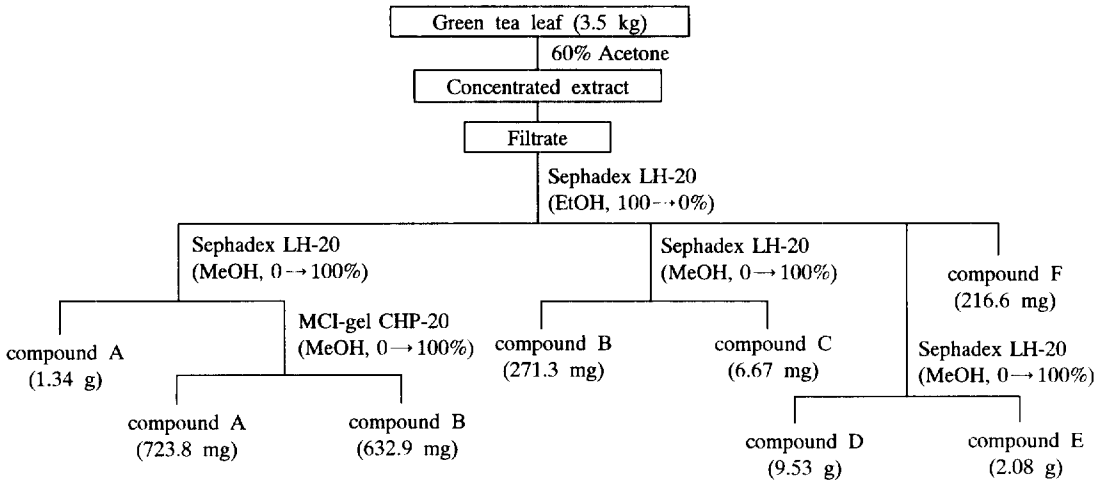


Fig. 1. A procedure for isolation of tannins from Korean green tea.

6.88~7.30 (6 H in total, m, B, B'-ring H), 7.63 (2 H in total, each s, G-H)로 측정되어 (+)-catechin, (-)-epicatechin-3-O-gallate, (-)-epigallocatechin-3-O-gallate, (+)-gallocatechin, (-)-epigallocatechin, procyanidin B-3-3-O-gallate로 동정하였다<sup>(14)</sup>.

효소 저해 효과

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등<sup>(13)</sup>의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 반응구는 1/15 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 1 mL, 10 µM DOPA 0.5 mL, 180 unit tyrosinase 0.5 mL와 탄닌용액 1.0 mL를 혼합하고, 대조구에는 탄닌 대신 증류수를 1.0 mL 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시키고 반응액 중에 생성된 DOPACHROME을 흡광도 475 nm에서 측정하여 다음 식으로 저해율을 구하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = 1 - \frac{\text{반응구의 O.D.}}{\text{대조구의 O.D.}} \times 100$$

결과 및 고찰

녹차 추출물의 효소저해 효과

녹차에서 추출 농축된 acetone 추출물을 동결건조하여 1 mL 당 1~2 mg으로 첨가하여 tyrosinase 저해효과를 살펴본 결과 Table 1에서와 같이 1 mg에서 38.64%, 2 mg에서 53.03%의 저해 효과를 나타내었다.

녹차추출물에서 정제한 축합형 탄닌의 tyrosinase 저해 효과

Table 1. Effect of acetone extract from Korean green tea on tyrosinase activity

Concentration (mg/mL)	Absorbance (475 nm)	Inhibition (%)
Control	0.132	---
1.0	0.081	38.64
2.0	0.062	53.03

Table 2. Effect of (-)-epicatechin-3-O-gallate from Korean green tea on tyrosinase activity

Concentration (µg/mL)	Absorbance (475 nm)	Inhibition (%)
Control	0.128	---
10	0.126	1.56
50	0.107	16.41
100	0.099	22.66

(+)-Catechin에 의한 tyrosinase 저해: 녹차로부터 정제된 (+)-catechin을 각 농도별로 첨가하여 tyrosinase의 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과 효소활성저해는 관찰되지 않았다

(-)-Epicatechin-3-O-gallate에 의한 tyrosinase 저해: (-)-Epicatechin-3-O-gallate를 10-100 µg 농도로 변화시키면서 처리한 결과 Table 2에서와 같이 전 농도에서 공히 큰 활성저해는 관찰되지 않았으며 100 µg에서만 22.66% 정도의 저해를 나타내었다.

(-)-Epigallocatechin-3-O-gallate에 의한 tyrosinase 저해: (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate를 10~100 µg 농도 범위에서 처리하여 tyrosinase 저해효과를 관찰한 결과 Table 3에서와 같이 10 µg 첨가 때부터 약 18%의 저해율을 나타내기 시작하여 100 µg의 농도에서 50%

**Table 3. Effect of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate from Korean green tea on tyrosinase activity**

Concentration (µg/mL)	Absorbance (475 nm)	Inhibition (%)
Control	0.128	---
10	0.105	17.97
50	0.076	40.63
100	0.065	49.22

**Table 4. Effect of (+)-gallocatechin from Korean green tea on tyrosinase activity**

Concentration (µg/mL)	Absorbance (475 nm)	Inhibition (%)
Control	0.128	---
10	0.110	14.06
50	0.082	35.94
100	0.081	36.72

가까운 저해효과를 나타내었다.

(+)-Gallocatechin에 의한 tyrosinase 저해: (+)-Gallocatechin을 각 농도별로 처리하여 tyrosinase 잔존활성을 살펴본 결과 Table 4에서와 같이 10 µg 첨가때부터 14.06%의 저해효과를 나타내기 시작하여 100 µg에서 최고 36.72%의 저해효과를 나타냈으나 저해효과는 비교적 낮게 나타났다.

(-)-Epigallocatechin에 의한 tyrosinase 저해: (-)-Epigallocatechin을 각 농도별로 처리하여 tyrosinase 활성을 살펴본 결과 Table 5에서와 같이 tyrosinase 저해효과는 50 µg 첨가시에 거의 40%에 가까운 저해효과를 나타내었으며, 100 µg 첨가시 약 51%의 저해효과로 비교적 저해작용이 우수한 것으로 판단되었다.

Procyanidin B-3-3-O-gallate에 의한 tyrosinase 저해: Procyanidin B-3-3-O-gallate를 각 농도별로 처리한 결과 Table 6에서와 같이 10 µg 첨가시 13.28%의 저해율로 농도가 증가할수록 저해효과도 증가하여 100 µg 첨가시 32.03%까지 저해효과가 상승하였으나 저해효과는 크지 않았다.

#### 탄닌 조합에 의한 상승 효과

저해활성이 비교적 높은 물질들을 서로 동량 조합하여 tyrosinase 저해효과를 살펴본 결과 50 µg에서는 상승효과가 거의 없었으며 100 µg 첨가시에 epigallocatechin-3-O-gallate와 epigallocatechin의 혼합물과 epigallocatechin-3-O-gallate, epigallocatechin과 gallocatechin의 혼합물에서 큰 상승효과는 없었으나 약 10%에 가까운 저해효과의 상승이 관찰되었다 (Table 7).

**Table 5. Effect of (-)-epigallocatechin from Korean green tea on tyrosinase activity**

Concentration (µg/mL)	Absorbance (475 nm)	Inhibition (%)
Control	0.128	---
10	0.108	15.63
50	0.080	37.50
100	0.063	50.78

**Table 6. Effect of procyanidin B-3-3-O-gallate from Korean green tea on tyrosinase activity**

Concentration (µg/mL)	Absorbance (475 nm)	Inhibition (%)
Control	0.128	---
10	0.111	13.28
50	0.107	16.41
100	0.087	32.03

**Table 7. Effect of mixed tannins<sup>1)</sup> from Korean green tea on tyrosinase activity**

Compound (1:1)	Concentration (µg/mL)	Absorbance (475 nm)	Inhibition (%)
Control	---	0.124	---
AB	50	0.084	32.26
	100	0.072	41.94
AC	50	0.085	31.45
	100	0.054	56.45
BC	50	0.095	23.39
	100	0.063	49.19
ABC	50	0.094	24.19
	100	0.052	58.07

<sup>1)</sup>A: (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate, B: (+)-Gallocatechin, C: (-)-Epigallocatechin.

Hatano 등<sup>6)</sup>은 flavonoid에 gallate가 붙으면 각종 효소의 저해효과가 증대된다고 보고 하였으나 본 실험에서의 tyrosinase 저해효과에서는 gallate화합물에 의한 효소저해효과 증대 현상이 관찰되지 않는 것으로 보아 phenol류에 결합된 상태의 gallate가 tyrosinase 구조변화에는 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다. 또한 catechin류 보다 입체구조상 A링의 OH가 더 많은 gallocatechin류와 catechin류의 epimer인 epicatechin류에서 효소활성 저해현상이 더욱 현저하였다. 이러한 현상은 dimer 이상의 tannin류가 각종 효소의 저해효과가 monomer보다 높다는 연구 보고<sup>(13,15,16)</sup>에도 불구하고 본 실험에서의 procyanidin B-3-3-O-gallate가 dimer이면서 다른 monomer의 저해효과보다 낮게 나타나 이물질이 catechin-3-O-gallate와 catechin 등 catechin류의 물질로만 구성되어 있기 때문으로 추측하였으며, 앞에서의 monomer들의 실험 결과와도 유사한 패턴을 나타내고 있었다.

요 약

기능성 식품과 tyrosinase에 의한 식품의 갈변 현상을 막기 위한 천연 효소 억제제의 개발을 위한 연구의 일환으로 한국산 녹차로부터 축합형 탄닌을 분리하여 tyrosinase 저해효과를 측정하였다. 녹차의 acetone 추출물에서 tyrosinase 저해효과가 있음이 확인되었고 정제된 탄닌의 효소저해효과를 검토한 결과 catechin류 보다 gallo catechin류와 epimer인 epicatechin류가 저해효과가 더 높았으며, dimer의 물질보다 monomer 물질에 의한 저해 효과가 더 우수한 것으로 나타났다.

문 헌

1. Sharma, A. and Sehgal, S.: Effect of domestic processing, cooking and germination on the trypsin inhibitor activity and tannin content of faba bean. *Plant Food for Human Nutrition*, **42**(2), 127 (1992)
2. Tan, N.H., Wong, K.C. and Lumen, B.O.: Relationship of tannin levels and trypsin inhibitor activity with the *in vitro* protein digestibilities of raw and heat-treated winged bean. *J. Agric. Food Chem.*, **32**(4), 819 (1984)
3. Scholz, E. and Rimpler, E.: Proanthocyanidins from *Krameria triandra* root. *Planta Medica.*, **55**, 379 (1989)
4. Funayama, S. and Hikono, H.: Hypotensive principles of *Diospyros kaki* Leaves. *Chem. Pharm. Bull.*, **27**(11), 2865 (1979)
5. Nonaka, G. and Nishioka, I.: Tannins and related compounds. X(1). Rhubarb(2): Isolation and structures of glycerol gallate, gallic acid glucoside gallate, galloyl glucoses and isolindleyin. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 1652 (1983)

6. Nagasawa, Y., Shibutani, S., Oura, H., Shoyama, Y. and Nishioka, I.: Effect of extract from rhei rhizoma on urea-nitrogen concentration in rat serum. *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 1736 (1980)
7. Hirose, Y., Yamaoka, H. and Nakayama, M.: A novel guasi-dimeric oxidation production of (+)-catechin from lipid peroxidation. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 567 (1990)
8. Armstrong, G.S.: A study of tannin protein interactions. *Dissertation Abstracts International*, **44**(9), 2695 (1984)
9. Okuda, T., Yoshida, T. and Ashida, M.: Tannins of medicinal plants and drugs. *Heterocycles*, **16**, 1681 (1981)
10. Namba, T., Tsunozuka, M., Takehara, Y., Nunome, S., Takeda, T., Kakiuchi, Y.Z., Kobayashi, K., Takagi, S. and Hattori, M.: Studies on dental caries prevention by traditional Chinese medicines (part IV). Screening of crude drugs for anti-plague action and effect of artemisia capillaris spikes on adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surface and synthesis of glucan by glucosyltransferase. *Shoyakugaku Zasshi*, **38**(3), 253 (1984)
11. 唐. "外台秘要", 人民衛生出版社, 北京, p.869 (1982)
12. 新註校定, "國譯本草綱目", 春陽堂 藏版, 東京, p.349 (1980)
13. Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N.: *Planta Med.*, **39**, 517 (1986)
14. 조영제, 안봉진, 최청 : 한국산 녹차로부터 탄닌의 분리 및 효소저해 효과, *한국생화학회지*, **26**(3), 216 (1993)
15. 안봉진 : 감나무잎과 jack fruit 잎으로 부터 glucosyltransferase, tyrosinase 저해물질 분리 및 구조연구, 박사학위 논문 (1991)
16. Hatano, T., Yasuhara, T., Yoshihara, R. and Okuda, T.: Inhibitory effects of galloylated flavonoids on xanthine oxidase. *Planta Med.*, **57**, 83 (1991)

(1996년 9월 12일 접수)