

차 부산물로부터 효소를 이용한 캠페롤 생산

임 운영 · † 김 은 기

인하대학교 공과대학 생물공학과

(접수 : 2007. 10. 14., 게재승인 : 2008. 4. 13.)

Production of kaempferol by enzymatic hydrolysis of tea seed extract

Yun-Young Lim and Eun-Ki Kim†

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

(Received : 2007. 10. 14., Accepted : 2008. 4. 13.)

Tea seed extract, a byproduct of tea processing, contains two kaempferol glycosides, camelliaside A and camelliaside B. Kaempferol was produced by enzymatic hydrolysis of glycosides. Optimum reaction conditions were investigated. Pectinex®100L was effective, producing kaempferol in 48 hrs. Optimum temperature and pH were 40°C and 4, respectively. Ratio of substrate and enzyme affected the yield. Under optimum conditions, 1.6g kaempferol per 1 kg tea seed extract was produced and 80% of kaempferol precipitated. This result shows that kaempferol could be produced mildly and effectively using tea-processing byproduct.

Key Words : Tea Seed Extract, Kaempferol, Enzymatic Hydrolysis

서 론

차는 아시아의 전역에 넓게 분포되어 많은 곳에서 재배되고 있다(1). 차는 매년 약 3억톤 가량이 생산되고 있으며, 녹차 20%, 우롱차 2%, 홍차 78%의 3종류가 있다(2). 최근 많은 연구가 진행되고 있는 녹차에는 카테킨으로 알려져 있는 폴리페놀 성분의 한 종류인 플라보노이드를 포함하고 있다(3). 폴리페놀의 주요한 구성요소인 녹차 카테킨은 항산화 활성을 많이 포함하고 있어서 그 사용이 점점 증가하고, 그로 인해 차의 찌에서 얻어지는 부산물의 생산량이 증가되고 있다(4). 이 부산물은 차의 찌에서 기름을 추출하고 남은 것으로서 사포닌과 플라보노이드 그리고 비타민과 같은 생물학적 활성을 가지고 있는 성분을 대량 포함하고 있다(5-6).

차 안에 포함되어 있는 주요한 폴리페놀은 flavan-3-ols과 플라보놀이다. 녹차 안에는 대략 77%의 flavan-3-ols 형태의 페놀 성분이 포함되어 많은 연구가 진행되고 있다. 그러나 자연계에서 배당체로 존재하는 플라보놀은 flavan-3-ols보다 안정한 구조이다. 플라보놀은 산업적인 목적으로 많은 생산이

이루어지고 있으나 순수한 플라보놀의 생산은 쉽지가 않다(5). 플라보놀은 많은 종류가 알려져 있으나 퀘세틴, 캠페롤, 미리세틴의 세 종류가 많이 존재하고 알려져 있다(7). 캠페롤(Fig. 1)은 자연계에서 캠페롤에 당이 결합되어 있는 형태로 존재한다.

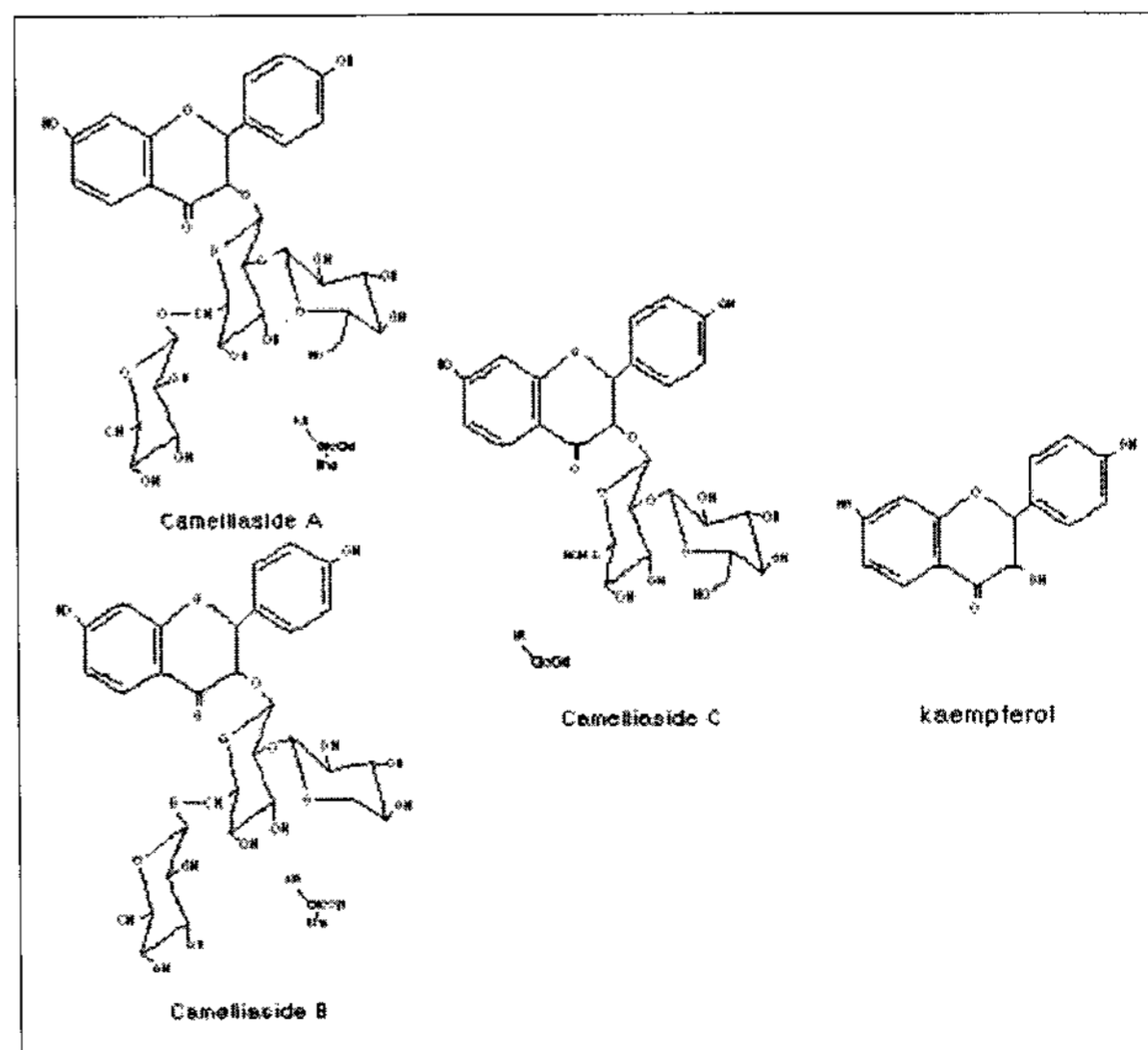


Figure 1. Schematics of kaempferol production from glycosides.

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

Tel : +82-32-872-4046, Fax : +82-32-860-7514

E-mail : ekkim@inha.ac.kr

또한 당화 억제 능력이 뛰어나 노화 억제와 성인병 치료에 효과적이다(8). 또한 항암과 항염의 효과도 가지고 있으며(9), 캠페롤은 5 α -Reductase 억제제로 사용되어 활성산소의 발생을 억제하고, 라디칼 등의 지속적인 축적에 의해 발생하는 노화억제효과가 뛰어나다. 여성호르몬인 에스트로겐에 영향을 주어 유방암과 전립선 암의 치료에도 사용된다(10). 또한 구리이온의 킬레이션에 의하여 타이로시네이즈의 억제제로서의 역할도 한다(11). 그리고 캠페롤은 항균활성을 가지고 있어서 천연보존제로 사용되며, Matrix metalloproteinase의 억제제로 사용되어 변형성 관절염, 만성 관절 류마티즘, 암세포전이 및 잇몸 염 등의 예방 치료제로 사용된다.

본 연구에서는 녹차 씨기름 추출물에 포함되어 있는 캠페롤 배당체로부터 효소를 이용하여 캠페롤을 생산하기 위한 최적 조건을 선정하는 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

효소를 이용한 가수분해

실험에 사용한 기질은 차의 사용 후 얻어진 씨에서 기름을 제거하고 얻어진 부산물을 중국으로부터 구입하였다. 캠페롤의 생산을 위해 반응에 사용한 효소는 노보자임으로부터 구매한 pectinex[®]100L을 사용하였다.

Pectinex[®]100L은 노보자임에서 개발한 고역가의 펙틴 분해 효소로, 특히 사과 및 배 주스의 펙틴 제거에 사용되고 있다. pectinex[®]100L는 갈색의 액체로서 발효된 냄새가 있으며, pH는 약 5정도에서 큰 활성을 보이며, 활성은 5000 FDU 55°C/ml이다.

기질과 효소반응 및 분석방법

차 부산물 (0.5 g)을 증류수 5 ml에 녹인 후 50°C에서 중탕하여 준비하였다. 반응에 사용한 효소는 pectinex[®]100L를 메탄올로 침전시켜 얻어진 침전물을 사용하였다. 각각의 효소는 0.02 M sodium-acetate buffer (pH 5.0)에 반응최종농도가 1 unit/ml이 되도록 사용하였다. 효소 반응이 끝난 후 1500 rpm (4°C)에서 20분간 원심분리 하였다.

효소반응이 끝난 반응물은 TLC 방법과 HPLC 방법을 사용하였다. 분석에 사용한 HPLC system은 Waters 1525 Binary HPLC Pump module과 2287 Dual λ Absorbance Detector로 구성되었다. 컬럼은 150 x 3.9 mm의 4 μ l의 pore size를 가지고 있는 Nova-pak C₁₈ reverse phase column을 사용하였다. UV 검출기의 파장은 254 nm로 사용하였다. 반응 후 Sample 분석에 사용한 이동상은 0.02 M NaH₂PO₄·2H₂O-Methanol-THF (5:3:2, v/v/v)를 사용하였다. 또한 차 부산물에 포함되어 있는 카멜리오사이드의 구조 분석을 위해 물질분리 하기 위해서 0.02 M NaH₂PO₄·2H₂O-Methanol-THF (7:2:1, v/v/v)의 이동상을 이용하였다. TLC 분석에는 Methanol-Chloroform (4:6, v/v)를 이용하여 Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ 실리카젤에서 실행하였다. 가수분해된 TLC plate는 10%의 H₂SO₄안에 넣은 후 10분 동안 121°C에서 가열하고 건조하였다.

결과 및 고찰

시간에 따른 기질과 효소 반응에 따른 캠페롤 생산량의 변화

효소 반응 시간은 72시간 동안 반응 하였고, 반응 중 6시간 간격으로 상등액과 침전물에 포함되어 있는 캠페롤의 양을 HPLC를 이용하여 분석하고 계산하였다. 반응이 시작됨과 동시에 차 부산물이 효소와 반응하여 줄어들고, 반응에 의하여 얻어진 캠페롤의 양이 늘어나는 것을 확인하였다(Fig. 2). 반응을 시작한 초반에는 상등액에 포함되어 있는 캠페롤의 양이 상대적으로 많았으나 24시간이 지난 후부터는 침전되어 얻어지는 캠페롤의 양이 점점증가 하였다. 반응을 시작한 후, 48시간이 지난 후부터 얻어지는 캠페롤의 생산량이 거의 변화 하지 않는 것을 확인하였다.

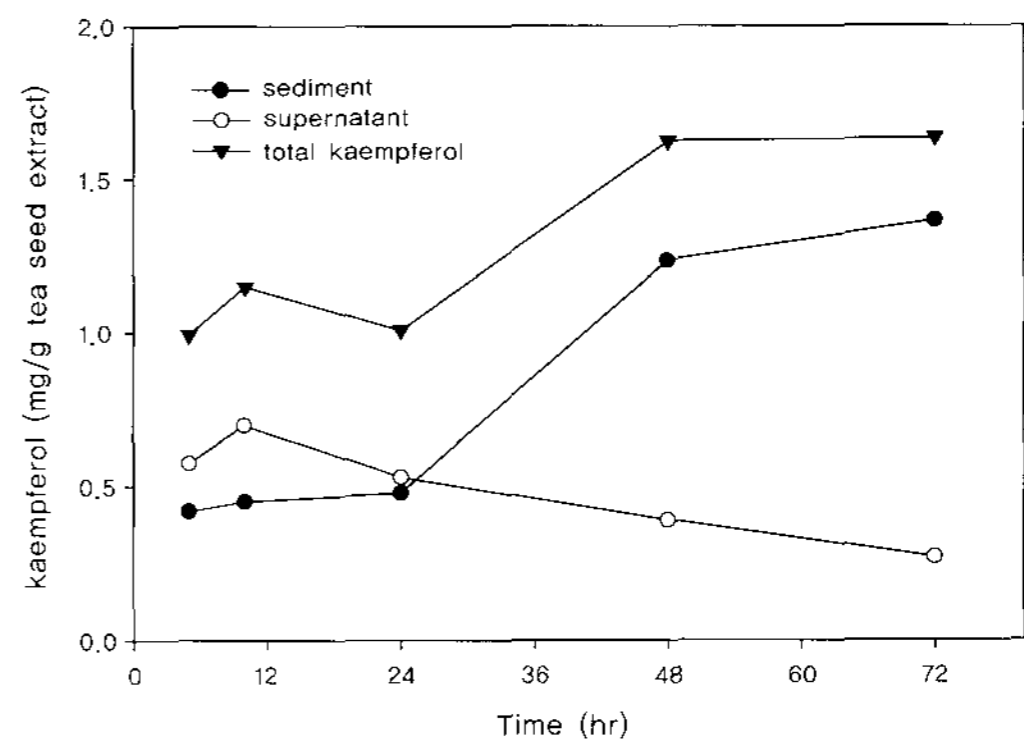


Figure 2. Time course production of kaempferol.

반응온도와 반응pH 변화에 따른 캠페롤 생산량의 변화 효소반응의 온도를 20°C에서 70°C까지 변화시켰다. 각 온도 별 반응 결과 20°C, 30°C, 70°C 에서는 캠페롤이 생산되긴 하였으나 많은 양을 얻지는 못하였다. 40°C~60°C에서는 활발한 반응이 일어나 낮은 온도에 비해 많은 양의 캠페롤을 얻을 수 있었다. 그 중에서도 40°C에서 가장 많은 캠페롤을 얻을 수 있었다(Fig. 3). 또한 효소 반응물의 pH 변화에 의해 활성과 안정성의 변화가 있기 때문에 각각의 pH에서 반응하였다. 반응물의 pH의 조절은 0.1 N NaOH와 0.1 M HCl을 사용하여 보정하였다. pH 2와 pH 7에서는 낮은 활성을 보였으며, pH 3에서 pH 6에서 많은 캠페롤을 생산하였다. pH 4에서 가장 많은 캠페롤을 얻을 수 있었다(Fig. 4).

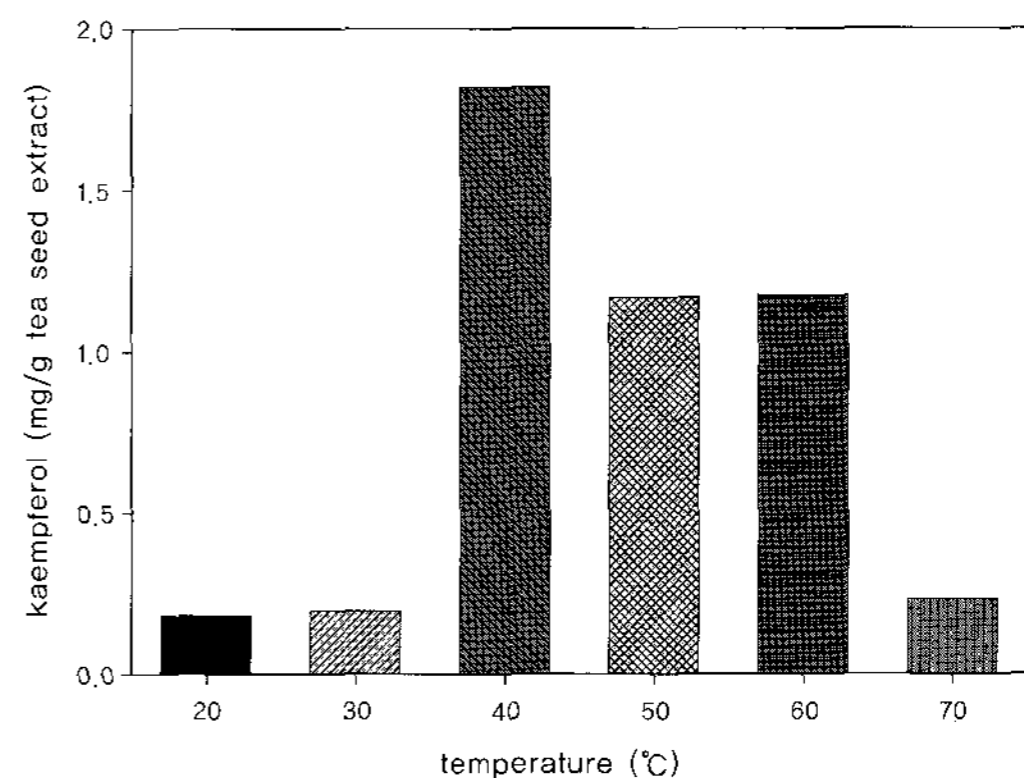


Figure 3. Effect of temperature on production of kaempferol.

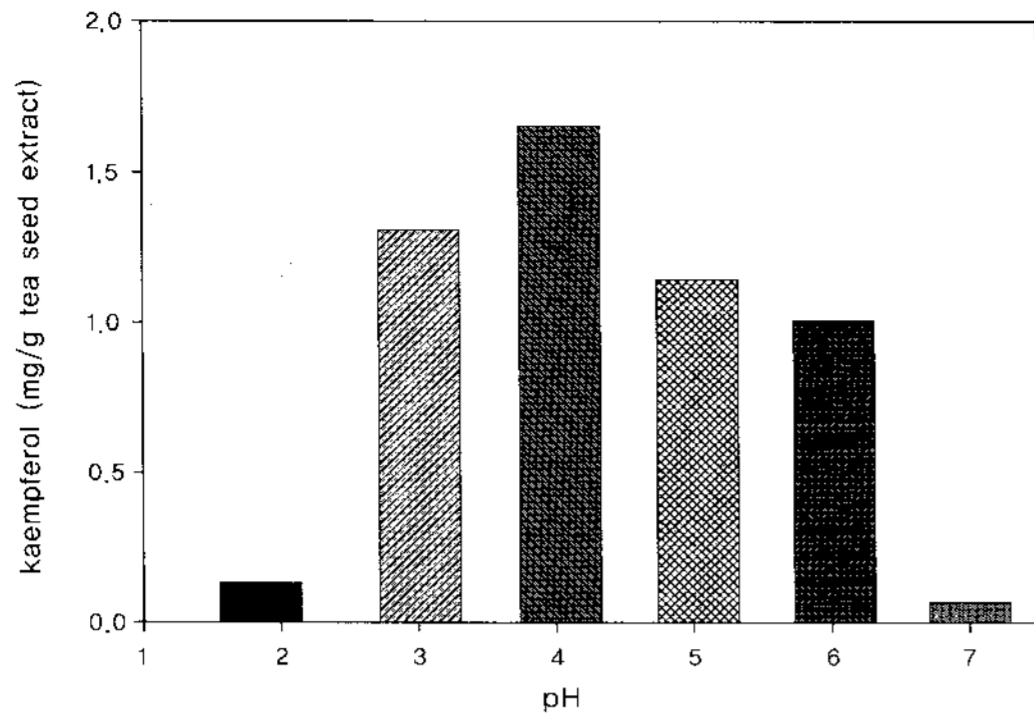


Figure 4. Effect of pH on production of kaempferol.

기질과 효소의 비율변화에 따른 캠페롤 생산량의 변화 기질과 효소반응에서 효소의 사용량을 줄여 보고자 기질과 효소의 반응 비율을 변화시켰고, 효소의 재사용이 가능한지를 확인하였다. 우선 기질과 효소의 비율변화는 table 1과 같이 기질을 양을 고정하고 효소의 양을 변화 시켰다. 효소의 양이 기질의 양에 1/10, 3/10, 1/2 일 경우에는 적은 량의 캠페롤이 생산되었다. 그에 비하여 효소와 기질의 비율이 같은 것과 효소의 비율이 두배로 실험한 결과 캠페롤의 생산량이 증가하였다. 이 결과를 이용하여 이후의 모든 효소반응은 기질에 양에 대한 효소의 양을 두 배로 하여 수행하였다.

Table 1. Effect of substrate/enzyme ratio on kaempferol production

Ratio (g substrate / unit)	Yield (mg / g substrate)
250	0.10
750	0.12
1250	0.15
2500	1.19
5000	1.50
10000	0.37

효소사용의 경제성을 증가하기 위해서 효소 Pectinex[®]100L의 재사용 여부를 확인하였다. 효소 반응 조건은 미리 실험을 통해 얻어진 최적 조건을 이용하였다. 재사용에 사용한 효소 반응 후 1500 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액만을 이용하여 다시 반응하였다. 반응한 결과 효소를 한번 사용한 것에 비하여 두 번 사용한 효소반응 후 캠페롤의 생산량은 반으로 줄지만 효소의 활성을 남아 있는 것으로 확인하였다. 그래서 효소를 세 번, 네 번 재사용하여 본 결과 효소의 활성이 네 번 재사용 하였을 때 크게 줄어드는 것을 확인하였다(Table 2).

Table 2. Repeated use of enzyme

Repetition	Yield (mg / g substrate)
New	1.47
1	0.67
2	0.63
3	0.33

위의 결과를 이용하여 효소의 활성이 반으로 줄어든 2번 사용한 효소에 소량의 사용하지 않은 효소를 첨가하여 반응하였다. 사용한 효소의 1/5인 0.2 ml과 2/5인 0.4 ml을 첨가

하여 반응하였을 때는 효소의 활성의 변화가 크게 나타나지 않았다. 그러나 반응에 사용한 효소의 3/5인 0.6 ml을 사용하여 반응 하였을 때 처음 반응에 효소를 사용하였을 때 보다 큰 활성을 확인하였다. 이러한 결과로 인하여 효소 Pectinex[®]100L은 재사용이 가능하며, 한번 반응에 사용한 효소에 사용하지 않은 효소를 소량 첨가하여 반응하면 좋은 활성을 가질 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

효소 pectinex[®]100L에 포함되어 있는 순수한 효소반응 상업화 되어 있는 효소인 Pectinex[®]100L는 많은 효소들이 포함되어 있다. 포함되어 있는 각각의 효소 중에서 가장 활성이 좋은 효소를 확인하고자 각각의 반응을 수행하였다. Pectinex[®]100L에 포함되어 있는 대표적인 효소는 pectinase, cellulase, hemicellulase, pectinesterase, β -galactosidase, hesperidinase이다. 이 각각의 효소를 이용하여 반응한 결과 pectinase, cellulase의 반응하였을 때 캠페롤이 생산되었다 (Table 3).

Table 3. Effect of hydrolytic enzyme on yield

Enzyme	Yield (mg / g substrate)
Pectinex [®] 100L	1.74
Pectinase	0.64
Cellulase	0.74
Hemicellulase	0.06
Pectinesterase	0.01
β -galactosidase	0

이 실험에서 기질과 β -galactosidase가 반응에 의해 기질에 포함되어 있는 camelliaside A와 camelliaside B가 camelliaside C로 변화하는 것을 확인하였다. Camelliaside C는 캠페롤에 당이 결합되어 있는 형태의 한 종류로 kaempferol-3-rutinoside의 구조로 알려져 있다. 또한 심장혈관과 혈전증의 치료로 사용되며, 진통제로도 사용되는 물질이다. 기질인 차 부산물과 β -galactosidase를 반응하여 효소의 최적 반응 시간을 확인하였다. 반응 시간을 48시간동안 반응하였고, 6시간마다 얻어지는 camelliaside C의 생산량을 확인하였다. 반응 결과는 기질과 β -galactosidase가 반응 하였을 때 12시간이 지난 후부터 모든 camelliaside A와 B가 camelliaside C로 전환되었다(Fig. 5). 또한 기질과 β -galactosidase의 반응 후, 다른 효소와 반응하였을 때 camelliaside C가 캠페롤을 생산할 수 있는지 확인하였다.

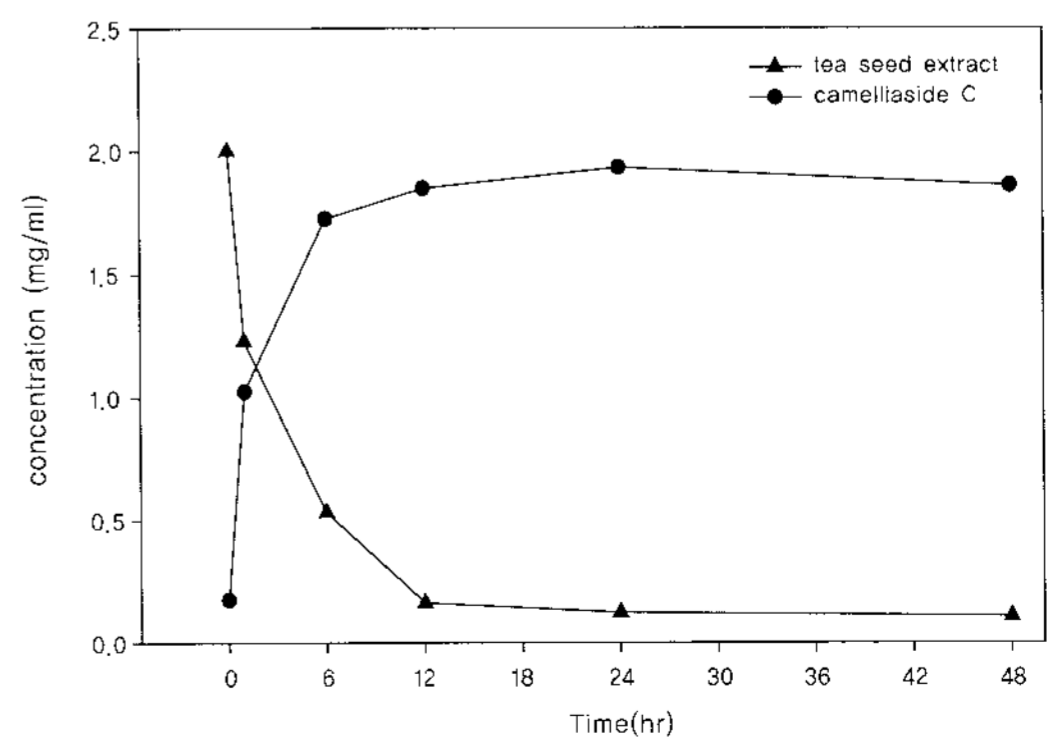


Figure 5. production of Camelliaside C by β -galactosidase.

두 번째 효소 반응에 이용한 효소는 hesperidinase이다. β -galactosidase 12시간 반응 후 hesperidinase를 사용하였다. Hesperidinase의 반응결과 12시간이 지나면서부터 캬페롤의 생산량이 증가하기 시작하였고, 24시간이 지난 후 거의 모든 camelliaside C가 캬페롤로 전환되었다.

요 약

캬페롤은 항산화, 항염등의 성질을 가지고 있지만 생산이 쉽지가 않다. 차의 씨를 가공하고 발생하는 부산물 (tea seed extract)에는 캬페롤과 당이 결합되어 있는 형태인 camelliaside A와 camelliaside B가 포함되어 있다. 본 실험에서는 캬페롤을 효소의 가수분해에 의하여 생산하였다. 가장 효과적인 효소는 pectinex[®]100L 이며, 효소 반응에서 캬페롤은 48시간내에 생산되었다. 반응 최적 조건은 40℃, pH 4이며 생산의 최적조건하에서 차 부산물 1 kg당 1.6 g의 캬페롤이 생산되었고 약 80%의 캬페롤이 침전되었다. 효소반응에 의한 캬페롤 생산법은 생산물의 회수가 용이한 효과적인 방법임을 알 수 있다.

감 사

본 연구는 한국과학재단의 우수연구센터 (조정밀 분리센터)의 지원을 받아 수행된 과제임.

REFERENCES

- Kim, M. and M. Masuda (1997), Chemistry and application of green tea. *Boca Raton* 61-73.
- Jerzy, J., Steven, H. S., and S. Rafal (1997), Why drinking green tea could prevent cancer, *Nature* **387**, 561.
- Masao Hirose, Yasumoto Mzoguchi, Makoto Yaono, Hikaru Tanaka, Tsuyoshi Yamaguchi, and Tomoyuki Shirai (1997), Effects of green tea catehins on the progression or late promotion stage of mammary gland carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats pretreated with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, *Cancer Letter* **112**, 141-147.
- Bun, S. S., Bun, H., D. Guedon, C. Rosier, and E. Olliver (2006), Effect of green tea extracts on liver functions in wistar rats. *Food and Chemical Toxicology* **44**(7), 1108-1113.
- Park, J. S., Rho, H. S., Kim, D. H., and I.S. Chang (2006), Enzymatic preparation of kaempferol from green tea seed and its antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(8), 2951-2956.
- Park, J. S., Yeom, M. H., Park, W. S., Joo, K. M., and Roh, H. S., Kim, D. H., I. S. Chang (2006), Enzymatic hydrolysis of green tea seed extract and its activity on 5 α -reductase inhibition. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **70**(2), 387-394.
- Toshikazu, S., Jiro, A., Atsuko, Y., Kazuki, S., Siripirn, O., Naoko, M., Shigeo, I., and M. Isamu (1991), Two flavonol glycosides from seeds of camellia sinensis. *Phytochemistry* **30**(3), 991-995.
- Fang, S. H., Yerra Koteswara Rao, and Yew-Min Tzeng (2005), Inhibitory effects of flavonol glycosides from Cinnamomum osmophloeum on inflammatory mediators in LPS/IFN- γ -activated murine macrophages, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **13**, 2381-2388.
- Wei, B. L., Lu, C. M., Tsao, L. T., Wang, J. P., and Lin, C. N. (2001), In vitro anti-inflammatory effects of quercetin 3-O-methyl ether and other constituents from Rhamnus species. *Planta Med.* **67**(8), 745-747.
- Lai K. Leung, Lai See Po, Tak Yee Lau, and Yee Man Yuen (2004), Effect of dietary flavonols on estrogen receptor transactivation and cell death induction, *British Journal of Nutrition*. **91**, 831-839.
- Rangkadilok N., Sitthimonchai S., Worasuttayangkurn L., Mahidol C., Ruchirawat M., and Satayavivad J. (2007), Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract. *Food Chem Toxicol* **45**(2), 328-336.