

녹차에 함유된 펩타이드 분리 방법 및 추출물의 특성 분석

유세진¹, 백석윤¹, 조준철¹, 박지원², 이성현³, 최호민³, 조문진⁴, 모상현⁴, 이정훈^{4*}

¹(주)아모레퍼시픽 기술연구원, ²에스아이에스

³(주)두래, ⁴(주)바이오프디엔씨 향노화연구소

*e-mail: jhlee@biofdnc.com

Characterizing and Analysis of the Peptide in Extract from *Camellia sinensis*

Se Jin Yoo¹, Seok Yun Baek¹, Jun Choel Cho¹, Jiwon Park², Sung Hyun Lee³, Ho Min Choi³, Moon Jin Cho⁴, Sang Hyun Moh^{4*}, Jeong Hun Lee^{4*}

¹Amorepacific R&D center, ²Scientific Instrument Services

³DURAE CORPORATION.

⁴Anti-aging Research Institute of BIO-FD&C Co.,Ltd.

요 약

본 연구는 알려진 녹차의 다양한 항산화, 항염 효능이 있는 Polyphenol 류 이외의 생물학적 활성을 가지는 펩타이드 및 당단백질 소재에 대한 특성과 분석을 위하여 연구되었다.

녹차에서 수용성 성분을 추출 후 알콜 침전방법을 사용하여 단백질과 펩타이드류를 분리하여 실험에 사용하였다. 전체 추출물 중에는 Glutamic acid가 14073.9ug/g, (39.11%)로 가장 높게 분석되었으며, GPC 분석결과 Mn 886, Mw 25218, Mp 890, Mw/Mn 28.46으로 분석이 되었으며, 전체적으로 3개의 피크로 분석되었다. 함유된 펩타이드를 분석하기 위하여 HPLC를 이용하여 RT 16.148min의 Fraction을 분리하여 펩타이드 분석결과 녹차에서 유래한 TNTLSN이라는 hexapeptide를 동정하였다.

이러한 펩타이드는 친수성이며, 안정도가 높은 특징을 가지고 있고, 분자량이 1000이하로 피부 흡수도가 높을 것으로 기대되며, Biodegradable하며, Renewable 한 자연 친화적인 화장품 소재로서 널리 활용될 수 있을 것으로 판단된다..

1. 서론

차나무는 *Camellia* 속으로 분류되는 82종 중 하나로 현재 아시아를 중심으로 아프리카, 남아메리카, 오세아니아 등의 50여개 국가에서 재배되고 있다.(1) 차의 종류는 차나무 잎의 가공방법에 의하여 크게 비발효차, 반발효차, 발효차, 후발효차로 구분되며, 이중 비발효차는 차나무에 함유된 Polyphenol Oxydase를 열처리에 의하여 불활성화물 시킨 것으로, 다른 차에 비하여 flavonol, flavanone, flavonoid 등의 Polyphenol 류를 많이 함유하고 있어 강한 항산화력을 나타내며, 이러한 물질들은 차 건조중량의 약 30%를 차지한다.(2)

비발효인 녹차의 다양한 효과들에 대하여 연구가 진행되고 있는데, 그중 녹차에 함유된 폴리페놀의 효과에 의하여 식도암, 폐암, 전립선암 등에 대한 항

암효과가 연구 보고 되고 있다.(3-5) 또한 녹차에 함유된 테아닌은 차에 함유된 아미노산 중 하나로, 차의 맛의 품질에 영향을 준다. 또한 긴장이완과 학습시 집중력 향상에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.(6)

차의 건강에 대한 이로운 오랜 역사를 통해서 증명이 되어왔으며, 최근의 연구에 의하면 차에 함유된 폴리페놀에 의하여 피부의 자외선 보호효과와 피부암 억제 효과가 있음이 밝혀졌고.(7) 녹차 추출물이 피부의 섬유아세포를 활성산소로부터 보호함이 증명되었다.(8) 이렇듯 녹차의 피부효능에 대한 연구가 최근에 밝혀지기 시작하며, 녹차를 이용한 화장품 및 의학용으로 산업화하는 시도들이 생기고 있다. 하지만 이러한 폴리페놀류의 단점은 산화에 취약하여, 산업화에 바로 적용 할 수 없다는 단점이 있으며, 안정화를 위한 공정을 추가시 비용이 상승

하게 되어 제품 적용성이 떨어지게 된다.

식물에 함유된 물질 중 산화에 안정하며, 구조가 단순하여 피부효능이 높을 것으로 기대되는 물질의 구조는 펩타이드이다. 식물에서의 펩타이드는 신호 전달 물질로 작용하며, 특히 식물의 성장과 분화, 외부의 자극에 의한 반응에 관여함이 연구되었다.(9) 이런 연구 결과들을 바탕으로 녹차에도 녹차 성장과 분화, 외부의 반응에 역할을 하는 독특한 펩타이드가 존재할 것으로 가정하고, 본 연구를 시작하였다. 그리고 지속가능성에 대한 이슈가 전세계적으로 퍼지면서 식물유래 피부효능 소재 발굴을 위해 다양한 연구 시도가 되고 있는 트렌드를 살펴볼 때, 안정성이 확보된 피부효능이 있는 당단백질 및 펩타이드를 찾는다면 글로벌 산업 경쟁요소로 작용할 수 있을 것으로 판단된다.

따라서 본 연구에서는 녹차에 함유된 폴리페놀 이외의 물리적 안정도가 높은 당단백질과 펩타이드를 분리하고, 분석하여 녹차로부터 유래하는 신규 물질 특성을 밝히고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료채취

실험에 사용한 녹차는 (주)장원의 서광다원에서 채취한 2010년 7월에 생산된 녹차로 옥록제법(증열-조유-유념-중유-제건-건조)으로 제조되었으며, 최종 건조된 녹차는 수분함량이 3% 미만으로 유지하였다.

2.2 시료 준비

건조된 녹차 100g 측정하여 정제수(80-90℃ 열수)를 5배 가하여 추출하였다. 온도를 유지하며 2시간 가열교반하고 상온으로 온도를 식힌 후에, 수용성 성분만 분리하고, Adventech No. 131을 이용하여 1차 여과한다. 여과물에 95% 에탄올을 전체 중량대비 40%를 교반하며 천천히 첨가하고, 이때 침전된 침전물을 제거한다. 이후 다시 전체 중량대비 2배에 해당하는 에탄올을 천천히 교반하며 첨가하고, 상등액의 클로로필은 제거하고, 침전된 것만 모아 열풍 건조한다. 열풍 건조시 30-40℃를 유지시켜주어, 열변성을 방지한다. 열풍 건조후 최종 수율은 녹차 중량대비 3%이며, 분말로 균질화하여 이를 실험에 사용하였다.

2.3 단백질 분해

단백질 분해는 Bromelain을 이용하여, pH6-7, 온도 50℃에서 overnight하여 단백질 분해하고, 85℃ 30분 가온하여 효소 실활시킨 후 상온으로 냉각한다. 그 후 규조토 여과 후 동결건조하여 단백질분해물을 제조하였다.

2.4 아미노산 분석

공시험액, 아미노산 표준혼합액 및 2.3에서 분해물이 함유된 검액을 20 µL씩 준비하여, HPLC 바이알에 넣고 AccQ-Tag amino acids derivatization kit의 유도체화 시액 중 borate buffer 70 µL, Flour reagent 2A 20 µL를 넣어 잘 흔들어 섞어 1분간 실온에 방치 후 55℃에서 10분간 반응시켜 형광 유도체화하여 검액으로 하였으며 검액과 표준액은 3회 반복 측정하였다.

2.5 HPLC 조건

분석 컬럼은 ACQUITY UPLC AccQ-Tag Ultra C18컬럼(2.1 * 100 mm, 1.7 µm)을 사용하였으며 이동상은 AccQ-Tag Ultra Eluent A, B를 이용하여 농도구배조건으로 분석하였으며 분리조건은 Table 1에 나타내었다.

[Table 1] HPLC Conditions for Determination of 22 Amino Acids

A : AccQ-Tag Ultra Eluent A(buffer),

B : AccQ-Tag Ultra Eluent B(1 % formic acid in Acetonitrile)

Time(min)	A(%)	B(%)
0	99.1	0.1
0.54	99.1	0.1
4.75	93.5	6.5
7.74	82.5	17.5
8.50	82.5	17.5
8.70	40.4	59.6
8.90	99.1	0.1
10.0	99.1	0.1
유속	0.7mL/min	
주입량	1 µL	
컬럼온도	60 °C	
검출	PDA 260 nm	

2.6 GPC (Gel permeation chromatography) 분석

2.2에서 추출한 분말을 이용하여 분자 특성을 분석하기 위하여 GPC 분석을 실시하였다. 시료는 물에 완전용해시킨 후, 0.45µm NYLON filter로 여과하여 사용하였다. 측정기기는 Waters GPC System,, 펌프 Waters 515, 검출기 Waters 410 Differentia Refractometer를 사용하였으며, 용매는 0.1 M NaNO3, 컬럼 및 분석조건은 TSKgel G4000PWxl + TSKgel G2500PWxl (7.8 x 300 mm), 온도는 35℃, 유속 1.0 mL/min, 주입량 100 µL, 데이터처리 EMPOWER, 표준물질은 PEG/PEO를 사용하여 분석하였다.

2.7 Analyzed Amino acid sequence

LC column에서 정제된 시료에 대한 아미노산 서열을 결정하기 위하여 dry 된 시료를 20%(v/v) acetonitrile/water 용매 20ul 로 녹인 후, biobrene 이 coating 되어져 있는 micro-filter 에 시료를 분주 및 건조를 하였고 edman degradation에 의한 N말단 아미노산 서열결정방법을 기반으로 분석되어지는 automatic amino acid sequencer ABI492 system (Applied Biosystems, Foster City, CA)을 이용하여 pulsed-liquid 방법으로 N말단으로부터 순차적으로 아미노산을 결정하였다. (Ref-1,2) 이때, 분석 장비에 대한 validation 은 beta-lactoglobulin 표준 단백질 10 pmol을 시료 분석과 동일과정으로 분석 하였을 때, PTH (Phenylthiodation)-amino acid 의 반복적인 수율은 93% 이상을 유지하고, 최초 유리된 PTH-amino acid 의 수율은 50% 이상을 유지하는 조건 하에서 분석을 실시하였다.

3. 결론 및 고찰

녹차 유래 당단백질과 펩타이드 추출물 수율 분석

녹차에 함유된 수용성 성분 중 폴리페놀과 클로로필을 제외한 당단백질과 펩타이드의 밝은 노란빛의 추출물을 최종적으로 제조하였다. 최종 수득율은 3%로 확인할 수 있었다.



Figure 1. 녹차유래 당단백질과 펩타이드 추출물

녹차유래 당단백질과 펩타이드의 아미노산 구성비

녹차 당단백질과 펩타이드 추출물을 2.3 조건으로 분해 후, 전체 아미노산 구성비를 조사하였다. 전체 아미노산 농도는 35987.4ug/g으로 분석되었고, 가장 많은 아미노산은 Glutamic acid로 14073.9ug/g, 39.11%로 분석되었고, 녹차에만 존재하는 Theanine 은 7533.9ug/g으로 두 번째로 많은 20.93%를 차지하였다. 신경전달 물질로 알려진 GABA는 1176.4ug/g, 3.27%로 분석되었다. Glycine를 포함한 11개종의 아미노산은 1% 미만으로 분석되었다.

[Table 2] 녹차유래 당 단백질과 펩타이드 추출물의 아미노산 구성비.

아미노산	농도 (ug/g)	분포비율(%)
총아미노산 합량	35987.4	100.00%
Glu	14073.9	39.11%
The	7533.9	20.93%
Asp	5698.7	15.84%
Arg	2495.6	6.93%
GABA	1176.4	3.27%
Tyr	663.3	1.84%
Gln	608	1.69%
Cys	551.3	1.53%
Ala	469.5	1.30%
Ser	461.3	1.28%
Thr	392.1	1.09%
Gly	298.3	0.83%
Lys	292.5	0.81%
Pro	269.9	0.75%
Val	264.6	0.74%
Ile	234.5	0.65%
Phe	151.1	0.42%
Met	117.1	0.33%
Leu	110.9	0.31%
His	91.4	0.25%
Trp	25.8	0.07%
Asn	7.5	0.02%

녹차 유래 당단백질과 펩타이드의 GPC 분석결과

2.6방법에 의하여 GPC 분석을 실시하였다. 총 두 번에 걸쳐 분석을 하였다. 수평균 분자량은 평균 886, 중량평균분자량은 25218, 최대피크분자량은 890 으로 분석이 되었으며, 다분산 지수인 Mw/Mn은 28.46으로 일반적인 중합 폴리머가 2정도인 것에 비하여, 매우 높은 것을 알 수 있다. 이를 통해 다양한 구조의 당단백질 및 펩타이드가 혼합되어 있음을 추측해 볼 수 있다.

[Table 3] GPC 결과. Mn:수평균분자량, Mw:중량평균분자량, Mp:최대피크분자량, Mw/Mn:분산도, Standard: PEG/PEO

구분	Mn	Mw	Mp	Mw/Mn
Test1	881	24613	895	27.94
Test1	891	25822	885	28.98
SD	7.07	854.89	7.07	-
CV	0.8	3.39	0.79	-
average	886	25218	890	28.46

분석피크를 분석해 보면 Test1 GPC 분석에서는 크게 세 개의 Peak가 관찰되었다. Peak1은 Mn

14586, Mw 77829, Mp 17206으로 Mw/Mn 비율이 5.34정도가 되었다. 하지만 Peak2와 Peak3에서는 다분산 지수가 각각 1.375, 1.000으로 단분자 형태를 가짐을 확인할 수 있었다. Peak2는 Mn 690, Mw 949, Mp 895이며, Peak3은 Mn286, Mw 286, Mp283으로 분석이 되었다. Test2 GPC 분석도 Test1 결과와 거의 유사하게 분석되었다.

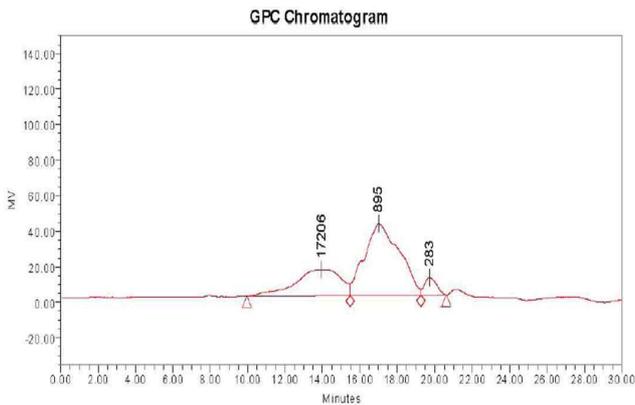


Figure 2. GPC test1 Chromatogram.

[Table 4] GPC test1 Chromatogram 분석표.

Peak Name	Mn	Mw	Mp	Mw/Mn	% Area	RT (min)
Peak1	14586	77829	17206	5.3358 73	30.79	13.971
Peak2	690	690	895	1.3751 76	63.84	17.011
Peak3	286	286	283	1.0002 1	5.37	19.744

녹차 유래 펩타이드 Fraction의 분리

Powder 20mg을 D.W. 1mL에 완전히 녹인 후, 20uL를 HPLC C18 Column loading해서 retention time 16.148 min에서 분리된 Fraction을 펩타이드 서열 분석을 하였다.

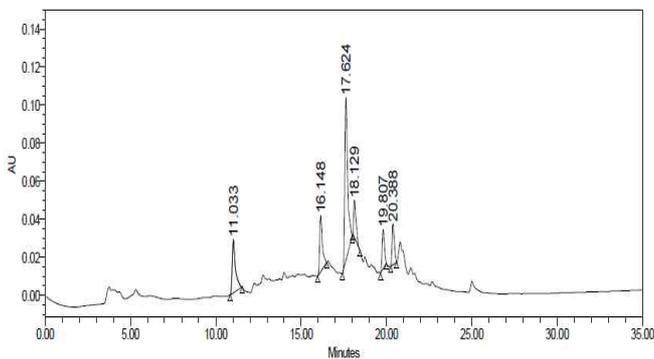


Figure 3. HPLC Chromatogram.

녹차 유래 펩타이드의 아미노산 서열 분석 결과

Figure 3에서 분리된 시료들 가운데 retention time 이 16.146 min 에서 확인된 시료 대하여 결정된 아미노산 서열은 Thr-Asn-The-Leu-Ser-Asn(분자량 738.6)으로 6개의 아미노산 서열로 결정이 되었다.(Table 5)

[Table 5] pmol table for PTH-derived amino acids from sample

* Redish bold : involved PTH-derived amino acid peaks

* Relative quantification : 8 pmol of standard PTH-derived amino acid

Cycle	ASP	ASN	SER	GLN	THR	GLY	GLU	HIS	ALA	ARG
1st	15.93	5.945	59.25	1.827	235	35.38	8.117	12.06	33.66	7.537
2nd	26.18	236.7	18.31	1.849	10.83	25.79	5.091	5.041	7.063	4.607
3rd	7.889	11.25	7.583	1.632	196.5	21.64	3.445	2.272	3.347	5.574
4th	5.189	5.52	5.237	2.161	11	18.6	3.231	1.56	2.832	3.77
5th	1.741	4.158	106.9	2.331	4.474	19.62	3.077	1.189	3.193	3.837
6th	13.8	164.1	14.1	2.273	3.661	20.81	3.518	1.236	3.375	5.533
7th	13.26	112.7	7.116	2.309	2.872	20.75	3.523	1.226	3.263	5.142
Cycle	TYR	CYS	PRO	MET	VAL	TRP	PHE	ILE	LYS	LEU
1st	26	0.378	5.893	3.191	11.89	0	7.919	6.742	13.57	9.551
2nd	8.439	0	2.85	0.765	3.493	0.981	1.789	2.858	4.618	4.999
3rd	3.724	0.163	2.265	1.263	2.334	0.469	1.1	2.269	2.111	3.461
4th	2.579	0.155	1.918	0	1.984	0	3.055	2.704	2.444	259.4
5th	4.549	0.107	1.797	0.848	2.17	0	1.305	2.082	2.081	19.18
6th	2.942	0	1.688	0.612	2.42	0	1.484	2.128	2.287	7.771
7th	2.955	0.128	1.457	0.655	2.615	0	1.901	2.467	2.634	6.38

분석된 아미노산은 Peak2(Fig.2)에 포함된 펩타이드로 판단된다. 이러한 펩타이드는 친수성이며, 안정도가 높은 특징을 가지고 있고, 분자량이 1000이하로 피부 흡수도가 높을것으로 기대되며, Biodegradable 하며, Renewable 한 자연 친화적인 화장품 소재로서 널리 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

4. 결론

본 연구는 녹차 추출물로부터 에탄올 침전을 통한 펩타이드들 성분 중에서 에드만서열 결정법을 통하여 아미노산 서열 분석을 통하여 친수성 hexapeptide인 TNTLSN을 확인하였다. 이러한 hexapeptide의 다양한 피부생리활성적인 연구는 더욱 필요할 것으로 사료되며, 녹차유래 펩타이드 소재는 화학적 합성으로도 가능하기 때문에 산업적 효용성이 클 것으로 판단된다.

5. 감사의 글

이 논문은 지식경제부 광역권연계협력사업(과제번호:R0000455) 및 한국산업단지공단 현장맞춤형기술개발사업(2011) 지원에 의하여 연구되었습니다.

6. 참고문헌

- [1] Jong-Tae Kim, 차의 과학과 문화, 29-30
- [2] Shin Young Park, Sun Joo Leel (2011). The Analysis of the Physiologic Activities of the Jeju Teas according to the Fermentational Degree Korean J. Plant Res. 24(2) : 236~242(2011)
- [3] Jian-Min Yuan (2001). Green tea and prevention of esophageal and lung cancers, *Mol. Nutr. Food Res.* 2011, 55, 886-04
- [4] Forester SC, Lambert JD.(2011). The role of antioxidant versus pro-oxidant effects of green tea polyphenols in cancer prevention. *Mol Nutr Food Res.* 2011 Jun;55(6):844-54
- [5] Khan N, Adhami VM, Mukhtar H.(2009). green tea polyphenols in chemoprevention of prostate cancer: preclinical and clinical studies. *Nutr Cancer.* 2009; 61(6):836-41.
- [6] Vuong QV, Bowyer MC, Roach PD. (2011). L-Theanine: properties, synthesis and isolation from tea. *J Sci Food Agric.* 2011 Aug 30;91(11):1931-9.
- [7] Afaq F, Katiyar SK. (2011). Polyphenols: skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. *Mini Rev Med Chem.* 2011 Dec 1;11(14):1200-15.
- [8] Silverberg JI, Jagdeo J, Patel M, Siegel D, Brody N. (2011). Green tea extract protects human skin fibroblasts from reactive oxygen species induced necrosis. *J Drugs Dermatol.* 2011 Oct;10(10):1096-101.
- [9] Keith Lindsey, Stuart Casson, Paul Chilly. (2002). CPeptides: new signalling molecules in plants. *TRENDS in Plant Science* Vol.7 No.2 February 2002