

탄닌산 분해 효소 처리에 따른 감 추출물 유효성분 변화 및 항산화능 활성 분석

조 유진, 오 찬진, 조건웅, 김현석, 홍주희, 박세이, 김현우[†]
**전라남도 산림자원연구소*

Analysis of Changes in Active Components and Antioxidant Activity of Persimmon Extract by Tannase

Eugene Cho, Chan-Jin Oh, Geon Ung cho, Hyun Suk Kim, Joo Hee Hong, Se I park
Hyoun Woo Kim[†]

**Jeollanam-do Forest Resource Research Institute, Naju 520-833, Korea*
(Received : Jul. 31, 2020, Revised : Aug. 31, 2020, Accepted : Sep. 20, 2020)

Abstract : Persimmons (*Diospyros kaki* Thub.) are produced mainly in the southern regions by 188,083 tons on an area of 11,132 ha, but only about 50% of the total is processed and consumed. This study attempted to find a way to increase the value of persimmon. Upon the measurement of the antioxidant activity (DPPH) of the persimmon extract at each site, it was found that an antioxidant activity of about 40% was highest in the immature pulp of the hydrothermal and ethanol (EtOH) extracts. As a result of analyzing 14 active ingredients or phenolic compounds by LC/MS/MS, it was discovered that the content of gallic acid was generally high. Therefore, the index component was selected as gallic acid and was referred to in the experiment. Previously, it was reported that when tannin acid was decomposed, the gallic acid content increased. Meanwhile, the gallic acid content increased by 3-4 times, as a result of Tannase treatment, following the change of the active ingredient in the extract. Based on these results, it is believed that developing a product that is utilized as a functional material is possible by increasing the active ingredient through tannic acid decomposition enzyme treatment of persimmon extract.

Keyword : Persimmon, Antioxidant activity, Tannase, Gallic acid, tannic acid

1. 서론

산림청 통계(2018)에 따르면 뽕은 감 생산량은 191,525톤으로 전체 감 생산량 중 뽕은 감이 차지하는 비중은 50% 이상이다[1]. 뽕은 감은 홍시, 꽃감, 감말랭이 등 여러 가지 가공 상품에 사용되고 있지만, 대부분은 가공되지 않고 있다. 수용성 탄닌은 모든 품종의 감에 존재하며 뽕은 맛을 낸다. 탄닌은 감이 성숙되면서 함량이 점차 감소한다. 이것을 탈삼이라고

하며 이러한 과정을 통해 단감과 뽕은 감으로 분류된다. 단감은 대부분 생과로 활용되며, 뽕은 감은 탄닌에 의한 뽕은 맛 때문에 인공적으로 탈삼시키거나 연시 혹은 꽃감, 감말랭이 등으로 소비되는 실정이다. 가공 방법의 다양화를 통하여 뽕은 감 활용도를 높이고자 하는 노력을 하고 있다. 그러나 뽕은 맛, 변색, 낙과 상처, 흠집, 갈변 등의 이유로 가공 공정상의 문제를 가지고 있다[2].

뽕은 감은 활용 가치와 효율성을 높이기 위한 변색방지를 위한 산화방지제 처리[3], 미세 분말화 효능의 증진[4], CO₂ 사용 탈삼[5] 등 다양한 가공방법이 나오고 있는 추세이나, 뽕은 감을 탈삼시킨 후 사용하여야 하는 단점을 가지고 있다. 이러한 이유로 뽕은 감의 유효성분인 감 탄닌을 유용하게 사용하고자 하는 방법을 모색하는 추세이다[6]. 다양한 유효성분과 효능을 가지고 있는 감(*Diospyros kaki* Thub.)은 매해 생산량은 증가하고 있지만, 감에 대한 연구는

[†]Corresponding Author

성명 : 김현우

소속 : 전남산림자원연구소 산림바이오과

주소 : 전남 나주시 산포면 다도로 7

전화 : 061-338-4264

E-mail : kgg909@korea.kr

미비한 실정이다. 특히 2018년 뽕은 감 총 수확량 5,323톤 중에 가공은 1,866톤, 저장은 928톤으로 49.7% 가량이 가공 되지 않는 실정이다(산림청 통계, 2018) [1]. 뽕은 감은 껍질이나 감 말랭이, 감식초 등의 제품으로 가공되어 소비되지만 이러한 제품은 자연적 또는 인공적인 후숙 및 탈삼 후 가공되어 생산된다. 이렇게 뽕은 감은 가공 형태에 제한적인 요소에 의해 산업적으로 한계를 보인다[7].

이러한 문제를 해결하여 뽕은 감에 다량 함유된 탄닌 및 폐놀성 화합물의 기능성 및 산업화 가공을 통한 소재 개발이 필요하다. 뽕은 감의 산업적인 효율성의 증대를 위해 유효성분의 기능성 평가를 위해서 뽕은 감의 주요 유효성분인 탄닌을 추출하여 분말화 후, 탄닌 분말의 저분자화를 유도 가용성 탄닌을 불용성 탄닌으로 변형 시키거나[6], 저장 기간의 증가를 위한 탄닌의 결화, 및 연료로 활용하기 위한 용해도 증가[8-10] 연구가 보고되었다. 이러한 연구에도 뽕은 감 가공 및 기능성 소재로의 활용이 아직은 미비한 실정이다.

이에 본 연구는 뽕은 감의 새로운 활용방안을 모색하고 뽕은 감 생산 농가 및 가공 기업의 매출 증가를 위해 감의 유효성분 및 생리활성 증가를 위한 공정을 개발하여 기능성 소재로 개발하고자 하였다.

2. 실험방법

2.1 실험재료 및 시약

실험에 사용한 뽕은 감 추출물은 2019년 전남영암군 혜성영농조합에서 채취한 후 세척하여 태양광 건조 후 저온저장(4℃)한 후 사용하였다.

자유라디칼 (free radical) 소거능 확인을 위한 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, D9132), gallic acid (398225), protocatechuic acid (E24859), 4-hydroxy benzoic acid (H20059), vanillic acid (94770), rutin (R5143), ferulic acid (128708), naringenin (N5893), oxyresveratrol (91211), caffeic acid (C0625), syringic acid (S6881), coumaric acid (C9008), benzoic acid (242381), nicotinic acid (72309), resveratrol (R5010), butylhydroxy anisole(BHA) 등은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Tannase 효소는 Bision(Seoul, ROK)에서 구입하여 사용하였다.

2.2 추출방법

뽕은 감 부산물(꼭지, 껍질)과 과육을 물과 에탄올을 용매로 하여, 추출 온도를 60℃하고, 3시간 동안 추출하였다. 물과 에탄올 각각의 용매 1L 와 시료 200g을 사용하여 초고속 추출기(KS-450C(25L), KYUNGSEO E&P, Incheon, ROK) 기기로 추출하였다. 추출 후 대용량 농축기(NVC-2200, N3010, ELYLA, New York, USA)로 농축 진행하고, 대용량 동결건조기(FDTI-5050, OPERON, Gimpo-si,

ROK) 및 유기용매 동결건조기(FDTI-12012, OPERON, Gimpo-si, ROK)로 건조 후 시료로 사용 하였다.

2.3 Free radical 소거능 측정

반응성이 매우 크며 상당히 불안정한 free radical 에 대한 소거능을 확인하는 실험으로 변형된 Blois방식의 DPPH법을 이용하였다[11]. 물과 에탄올 추출 물을 각각 0, 250, 500, 1000 µg/mL로 준비하고 96-well plate에 0.1 mL씩 넣고 여기에 1 mM DPPH 0.1 mL을 가한 후 실온, 암실 환경 하에서 30분간 반응을 시켰다. 이후 UV/VIS spectrophotometer (OASYS UVM 340, Biochrom, Chambridge, England)를 이용하여 560nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 넣지 않은 군을 대조군(control)로 하여 free radical 소거능을 구하였다.

2.4 LC-MS/MS를 이용한 Phenolic compounds 분석

뽕은 감 추출물에 함유된 phenolic compounds를 정량적으로 분석해보기 위해, 대표적인 15종의 polyphenol류에 대한 LC-MS/MS(API 4000 Q-TRAP, Prominence 20A series, AB SCIEX, Shimadzu) 분석을 시행하였다. 정량 분석에 사용된 표준물질들은 Bergenin, protocatechuic acid, 4-hydroxy benzoic acid, caffeic acid, syringic acid, vanillic acid, coumaric acid, rutin, ferulic acid, oxyresveratrol, naringenin, resveratrol, benzoic acid, nicotinic acid, gallic acid였다. 분석 물질의 정량 분석에는 LC-MS/MS (AB SCIEX 4000 Q Trap LC-MS/MS System, Shimadzu LC 20A System, Japan)가 사용되었다. 분리에 사용된 컬럼은 Gemini 3 µm, C18 110A 50 mm*2.0 mm을 사용하였고, Column oven 온도는 40℃, autosampler의 온도는 15℃로 하였다. 이동상은 gradient 방식으로, 0.1% 포름산 용액(A)과 0.1% 포름산이 포함된 acetonitrile(B)가 사용되었다. 유속은 0.3 mL/min이고, 시료 주입량은 10 µL였다. 이동상은 B액을 0%에서 시작하여 0.5분에 20%까지 증가시키고, 2분에 80%까지 증가시키고 2.5분까지 그대로 유지하다가 2.6분까지 20%로 다시 낮추고 6분까지 유지시켰다. MS/MS의 조건은 Turbo Ion Spray방식으로, 검출기 온도는 400℃, Negative mode로 spray voltage는 -4500V이고, 커튼가스 (curtain gas)는 30psi, Gas 1 그리고 Gas 2 모두 50psi였다.

2.5 탄닌산 분해효소(Tannase) 처리

뽕은 감 부산물(꼭지, 껍질)과 과육을 물 (hydrothermal) 추출물 10ml에 tannase 0.3g(≥ 500 U/g)를 첨가하여 37℃의 배양기에서, 2시간 동안 반응 처리하였다[12]. 효소 불활성화를 위해 5분 간 100℃에서 가열한, 효소처리 시료를 사용하였다.

2.6 통계처리

본 실험의 결과들은 모든 결과는 t-test 검정을 통해 통계적 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였고, 평균 ± 표준편차로 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1 Free radical(DPPH) 소거능 측정

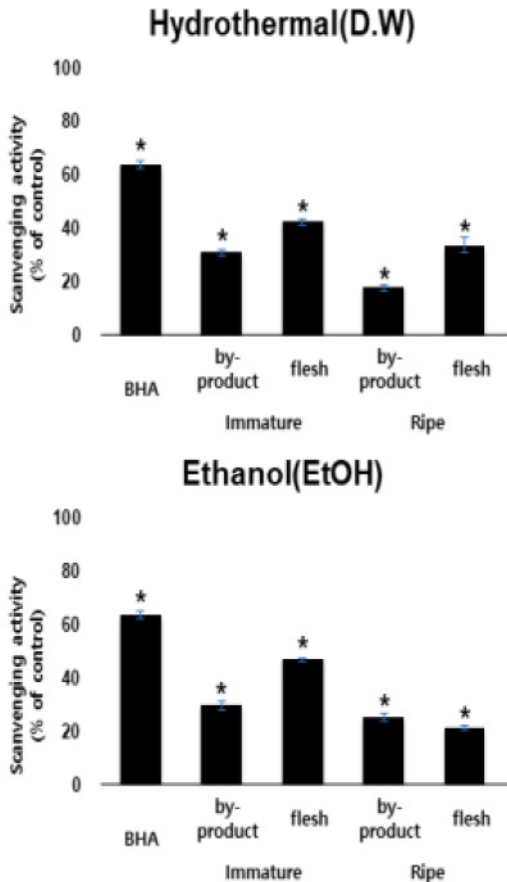


Figure 1. DPPH radical scavenging activity of the hydrothermal and ethanol extracts of Persimmons (*Diospyros kaki* Thub.)(0.1mg) and BHA(0.1mg). The values are expressed as the means ± the standard deviations of three experiments.(* $p < 0.05$)

공유되지 않은 홀 전자를 가진 원자단을 Free radical이라고 한다. Free radical은 매우 큰 불안정성과 반응성으로 인해 DNA 및 단백질과 결합하여, 신체에 손상을 일으켜 성인병을 유발하고 노화를 촉진하는 원인으로 알려져 있다. Free radical 소거능을 측정하는 대표적인 방법은 DPPH를 이용한 항산화력

측정법이다. 꾀은 감 용매, 부위(부산물, 과육), 시기 상태(미성숙, 성숙)에 따른 꾀은 감 추출물의 항산화능(DPPH)을 비교 분석 하였다. 양성대조군 BHA는 63.9%의 항산화능이 측정되었다. BHA보다는 낮지만, 열수(hydrothermal) 추출물 미성숙 부산물과 과육 추출물 비교 결과 미성숙 과육에서 약 42.4% 가장 높은 항산화능을 보였다. 성숙 추출물에서도 과육에서 33.7% 항산화능을 보였지만 전체적으로 미성숙 과육이 가장 높은 항산화능을 보였다. 에탄올(EtOH) 추출물 시험 결과 역시 미성숙 과육 추출물이 47.0%로 항산화능이 가장 높게 측정 되었다(Fig. 1). 본 실험의 결과 꾀은 감 추출물의 항산화력은 양성대조군 BHA보다 더 약하지만, 열수, 에탄올 미성숙 과육에서 약 40% 정도의 항산화력이 있음을 확인하였다.

3.2 꾀은 감 추출물의 Phenolic compounds 분석

꾀은 감 열수 추출물과, 에탄올 추출물에 대한 phenolic compounds 정량 분석을 실시하였다. 총 14개의 표준물질 (Protocatechuic acid, 4-hydroxy benzoic acid, caffeic acid, syringic acid, vanillic acid, coumaric acid, rutin, ferulic acid, oxyresveratrol, naringenin, resveratrol, benzoic acid, nicotinic acid, gallic acid)에 대해 LC-MS/MS를 이용한 분석을 실시하였다. 에탄올 추출물 (1 mg/mL)을 분석한 결과 열수, 에탄올 추출물 모두에서 gallic acid의 정량값이 전반적으로 높게 나타났다. 열수 추출물의 미성숙 부산물 1.040 ng/ml, 과육 1,780 ng/ml, 성숙 부산물 164 ng/ml, 과육 246 ng/ml의 gallic acid 정량값을 확인하였고, 에탄올 추출물은 미성숙 부산물 1,050 ng/ml, 과육 843 ng/ml, 성숙 부산물 325 ng/ml, 643 ng/ml의 gallic acid 정량값을 확인하였다. [Table 1, 2].

이러한 결과를 바탕으로 꾀은 감 추출물의 지표물질을 gallic acid로 하여 실험을 진행 하였다. 추가로 꾀은 감 열수 추출물의 tannic acid 분석 결과, 미성숙 부산물 2,768 ug/ml, 과육 4,496 ug/ml, 성숙 부산물 268 ug/ml, 과육 734 ug/ml의 정량값을 확인하였다(Fig. 2), [Table 3].

Table 1. Amount of phenolic compounds in the hydrothermal(D.W) extracts of Persimmons (Diospyros kaki Thunb.) with LC-MS/MS

(ng/ml)

Solvent	Target analyte phenolic compounds	Immature		Ripe	
		by-product	flesh	by-product	flesh
Hydrothermal (D.W)	Protocatechuic acid	N/D	N/D	N/D	N/D
	4-hydroxybenzoic acid	0.53	N/D	16.4	6.02
	Caffeic acid	1.77	N/D	N/D	N/D
	Syringic acid	4.36	N/D	2.53	1.39
	Vanillic acid	12.50	N/D	9.98	2.77
	Coumaric acid	4.69	1.95	4.23	1.03
	Rutin	21.10	0.30	N/D	N/D
	Ferulic acid	7.61	0.06	1.79	0.59
	Oxyresveratrol	1.19	N/D	N/D	N/D
	Naringein	2.34	0.835	N/D	N/D
	Resveratol	1.35	N/D	N/D	N/D
	Benzoic acid	N/D	N/D	N/D	N/D
	Nicotinic acid	1.86	0.53	N/D	0.89
	Gallic acid	1,040	1,780	164	246

Table 2. Amount of phenolic compounds in the ethanol(EtOH) extracts of Persimmons (Diospyros kaki Thunb.) with LC-MS/MS

(ng/ml)

Solvent	Target analyte phenolic compounds	Immature		Ripe	
		by-product	flesh	by-product	flesh
Ethanol (EtOH)	Protocatechuic acid	0.45	N/D	1.52	N/D
	4-hydroxybenzoic acid	0.744	N/D	11.8	3.01
	Caffeic acid	1.81	N/D	N/D	N/D
	Syringic acid	3.90	N/D	4	1.14
	Vanillic acid	10.90	N/D	15.1	1.55
	Coumaric acid	3.92	N/D	1.23	N/D
	Rutin	42.10	2.53	3.63	0.12
	Ferulic acid	9.36	N/D	7.7	0.31
	Oxyresveratrol	N/D	N/D	N/D	N/D
	Naringein	0.79	N/D	1.23	0.64
	Resveratol	N/D	N/D	0.03	N/D
	Benzoic acid	13.8	N/D	15.40	5.19
	Nicotinic acid	2.53	1.3	1.14	0.58
	Gallic acid	1,050	843	325	643

N. D. : Not detected

3.3 Tannase 처리 뽕은 감 추출물의 Phenolic compounds 분석

뽕은 감 열수 추출물에 탄닌산 분해 효소 tannase 를 처리 후 LC-MS/MS로 phenolic compounds 정량 분석 변화를 확인 하였다. 총 14개의 표준물질 (Protocatechuic acid, 4-hydroxy benzoic acid, caffeic acid, syringic acid, vanillic acid, coumaric acid, rutin, ferulic acid, oxyresveratrol, naringenin, resveratrol, benzoic acid, nicotinic acid, gallic acid)에 대해 LC-MS/MS를 이용한 분석을 실시하였다. Tannase 처리 추출물 (1 mg/mL)을 분석한 결과 gallic acid의 정량값이 전반적으로 증가 한 것을 확인 하였다. 미성숙 부산물 4,890 ng/ml, 과육 5,516 ng/ml, 성숙 부산물 838 ng/ml, 과육 287 ng/ml으로 처리 전 추출물과 비교하여 최고 약 5배까지 gallic acid 정량값의 증가를 확인하였다(Table 4), tannic acid의 경우 tannase 처리 후 분석 결과, 미성숙 부산물 1,442 ug/ml, 과육 2,397 ug/ml, 성숙 부산물 296 ug/ml, 과육443 ug/ml의 정량값이 최고 약 2배의 감소를 확인하였다[Fig. 2], [Table 3].

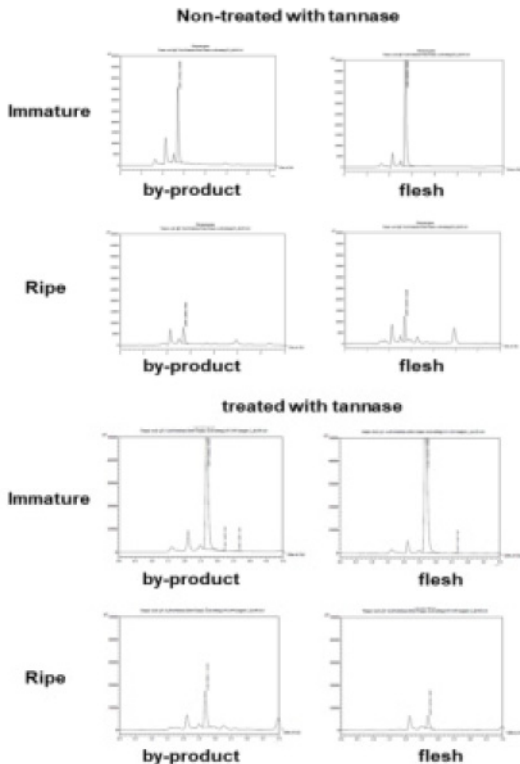


Figure 2. Changes in the quantitative value of tannic acid were measured before and after the tannase treatment of the hydrothermal extract, it was confirmed that the quantitative value of tannic acid was decreased in the extract treated with tannase.

Table 3. Amount of tannic acid in the tannase non-treated and treated hydrothermal(D.W) extracts of Persimmons (Diospyros kaki Thub.) (ug/ml)

Tannase	Target analyte phenolic compounds	Immature		Ripe	
		by-product	flesh	by-product	flesh
Non-treated	Tannic acid	2,768	4,496	268	734
Treated	Tannic acid	1,442	2,397	296	443

Table 4. Amount of phenolic compounds in the tannase treated hydrothermal(D.W) extracts of Persimmons(Diospyros kaki Thub.) with LC-MS/MS (ng/ml)

Solvent	Target analyte phenolic compounds	Immature		Ripe	
		by-product	flesh	by-product	flesh
Hydrothermal (D.W)	Protocatechuic acid	N/D	N/D	2.57	N/D
	4-hydroxybenzoic acid	5.78	1.40	31.70	77.40
	Caffeic acid	6.71	2.70	4.38	3.37
	Syringic acid	20.60	N/D	8.28	15.00
	Vanillic acid	63.40	N/D	18.60	56.70
	Coumaric acid	32.20	20.50	17.40	30.00
	Rutin	24.50	1.14	0.83	1.06
	Ferulic acid	18.70	1.77	3.87	10.40
	Oxyresveratrol	N/D	N/D	N/D	N/D
	Naringenin	1.19	2.83	0.16	0.28
	Resveratrol	N/D	N/D	N/D	N/D
	Benzoic acid	N/D	N/D	14.30	0.83
	Nicotinic acid	1.12	0.96	2.22	N/D
	Gallic acid	4,890	5,516	838	287

N. D.: Not detected

3.4 Tannase 처리 뽕은 감 추출물 Free radical(DPPH) 소거는 측정

Tannase 처리 뽕은 감 추출물의 항산화능(DPPH)을 측정 하였다. 양성대조군 BHA는 60.0%의 항산화능이 측정되었다. 측정 결과 미성숙 부산물 47.5%, 과육 51.1%, 성숙 부산물 48.2%, 과육 52.5%의 항산화능 증가를 보였다. 성숙 미성숙 추출물 전반적으로 항산화능이 8.4% ~ 21.4%까지 증가하였다(Fig. 3). 본 실험의 결과 뽕은 감 추출물 탄닌산 분해 효소에 의한 phenolic compounds중 특히 gallic acid 정량 변화에 따른 항산화능 증가를 확인하였다.

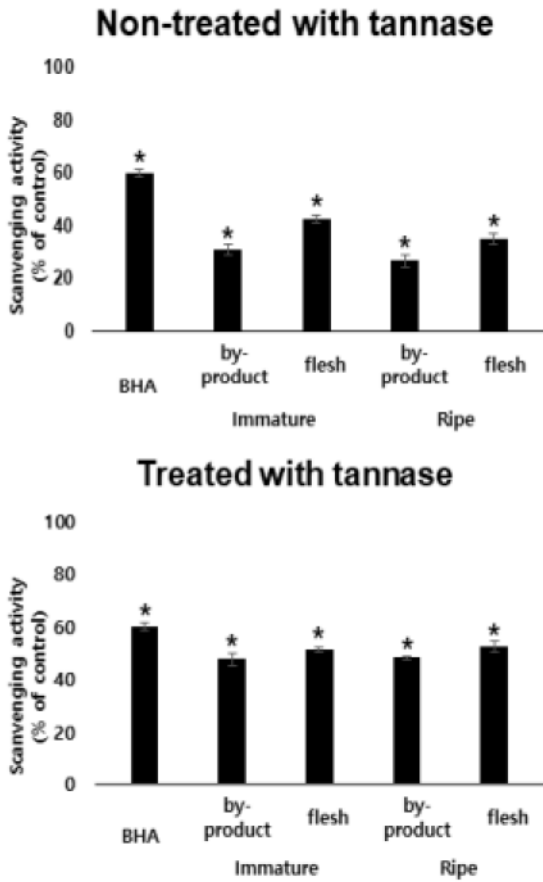


Figure 3. Antioxidant activity (DPPH) of the hydrothermal extract was measured before and after tannase treatment. The antioxidant activity was increased in the extract treated with tannase. (* $p < 0.05$)

4. 결 론

본 연구에서는 떫은 감의 새로운 활용방안을 모색하고자 열수, 에탄올 추출물에 항산화능(DPPH), LC-MS/MS를 통한 phenolic compounds 분석, tannase 처리를 통한 항산화능과 phenolic compounds 정량 변화 등을 시험하였다. 항산화능은 열수, 에탄올 추출물 미성숙 과육에서 약 40%의 항산화능을 보였다. 하지만 tannase 처리 후에는 열수 미성숙, 성숙 추출물 모두에서 약 47% 이상의 항산화능을 보여 효소 처리에 의한 항산화능 증가를 보여 주었다. 열수, 에탄올 추출물을 대상으로 LC-MS/MS를 이용한 15가지 표준물질 함량을 조사한 결과 gallic acid의 함량이 가장 높았고, 역시 효소 처리 후 열수 추출물 분석결과 gallic acid의 정량이 최고 5배까지 증가하였다. 반면에 tannic acid는 tannase에 의해 분해 되어 최고 2배까지 감소하였다. 이러한 결과, 떫

은 감이 열수 추출물에 tannase 처리 하여 증가하는 gallic acid를 활용한 새로운 활용방안 및 기술개발을 통하여 떫은 감이 새로운 소재 개발 및 산업화를 통한 소비 증진이 가능할 것이라고 생각된다.

사사 : 본 결과물은 중소벤처기업부 재원으로 (재)전남테크노파크 지역수요맞춤형 연구개발사업의 지원을 받아 연구되었음(과제번호 : B0081220000485)

참고문헌

1. <https://www.forest.go.kr/> 2018 Forestry Production Cost Survey Report (2019).
2. Said, S., Fonseca M. j. V., Siessere, V., World J. Microbiol. Biotechnol. 7, 607-608 (1991).
3. Park, Y. K., Kim, H. M., Kang Y. H., J. Korean Soc Food Sci Nutr. 13, 103-110 (2000).
4. Heo, J. C., Lee, K. Y., Lee, B. G., Choi, S. Y., Lee, S. H., Lee, S. H., Korean J. Food Preserv. 17, 145-150(2010).
5. Ham, Y. J., Park Y. M., J. Kor. Soc. Hort. Sci. 44(4), 417-421(2003).
6. Seo, J. H., Jeong, Y. J., Shim, S. R., Kim, J. N., Kim, K. S., Korean J Postharvest Sci Technol. 6, 328-332(1999).
7. Jeong, C. H., Kwak, J. H., Kim, J. H., Choi, G. N., Jeong, H. R., Kim, D. O., Heo, H. J., Korean J. Food Preserv. 17(4), 526-532(2010).
8. Byun, G. I, Kwon Y. J., Park, M. L., Culinary science and hospitality research. 14(2), 273-285(2008).
9. Yang, H. S., Lee, Y. C., Korean J. Food Sci. Technol. 32, 335-340(2000).
10. Yoon, S. H., Im, Y. J., Fiber Technology and Industry. 9(2), 162-176(2005).
11. Eugenio José Garcial, E. J., Oldoni, T. L. C., Alencar, S. M., Reis, A., Loguercio, A. D., Grande, M., R. H., Braz. Dent. J. 23(1), 22-27(2012).
12. Kim, D. H., Lee, J., Kang, B. S., Korean J. Food & Nutr. 2(4), 720-724(2011.)