

탄닌분해효소를 이용한 녹차 농축액의 품질 변화

김동호 · 이 진* · 강병선**

서원대학교 보은황토대추사업단, *천안연암대학 외식산업과, **천안연암대학 친환경원예과

Changes in the Quality of Green Tea Concentration through Tannase Treatment

Dong-Ho Kim, Jin Lee* and †Byung-Sun Kang**

Institute of Industry-Academy Collaboration, Seowon University, Cheongju 361-742, Korea

**Dept. of Food Service Industry, Cheonan Yonam College, Cheonan 330-709, Korea*

***Dept. of Eco-Friendly Horticulture, Cheonan Yonam College, Cheonan 330-709, Korea*

Abstract

Differences in sensory evaluation, physicochemical properties and antioxidant activities between green tea concentrations and tannase-treated green tea concentrations were measured in this study. The results showed that pH did not differ dependent on tannase treatment but antioxidant ability were slightly increased through tannase treatment without significant ($p < 0.05$). However, the turbidity of the tannase-treated green tea concentration had significant difference to the non-treated concentration. The astringency, tested via sensory evaluation, decreased significantly after tannase treatment ($p < 0.05$). Traces of epicatechin gallate(ECG) and epigallocatechin gallate(EGCG) also disappeared after the tannase treatment, due to the fact that the ester linkages in the catechin structure were broken by the tannase. It was concluded that tannase treatment of tea products is a very effective process for decreasing astringency and turbidity.

Key words: tannase, astringency, epicatechin gallate(ECG), epigallocatechin gallate(EGCG), green tea

서 론

차나무(*Camellia sinensis*)의 잎을 가공하여 제조하는 차는 경험적으로 알려진 여러 가지 질병치료 효과 때문에 건강, 보 건성 음료로 정착되고 있으며, 다양한 가공제품을 개발하여 현재에 이르고 있다(Bang & Park 2000).

차에는 카테킨, 카페인, 플라보놀 유도체, 안토시안 등이 함유되어 있으며, 이들 물질들은 여러 가지 약리효과를 가지는 것으로 보고되고 있는데, 특히 카테킨류의 효과에 대한 보고가 많다(Choi SH 2009). 이들 녹차 성분 중 카테킨류에 의한 항산화, 혈압 강화, 암 발생 억제 등 여러 가지 약리적 효 능이 계속 밝혀지고 있으며, 차의 여러 가지 기능성이 과학적 으로 규명되어짐에 따라 현대인의 건강 지향적인 욕구와 부 합되어 소비량이 점차 증가하고 있다(Sung 등 2011; Choi 등

2011).

건강 기능성이 알려진 녹차를 소재로 여러 가지 제품이 증 가하는 추세이지만 녹차에 존재하는 탄닌에 의한 떫은맛과 혼 탁화 때문에 제품 개발에 어려움이 있다. 탄닌은 polyphenolic compound의 일종으로 식품 가공 시 침전 및 혼탁물을 형성하 고 떫은맛을 나타내어 식품가공 시 많은 장애를 일으킨다 (Ravichandran & Parthiban 1998). 또한 탄닌은 단백질과 결합 하는 능력이 강하므로 단백질의 소화를 억제하고 Vit. B₁₂와 결합을 형성하여 장내 흡수를 저해하며, 소화효소 단백질과 결 합하여 효소의 활성을 억제하는 문제점이 있다(Rodriguez 등 2008; Gu 등 2003).

떫은맛이 있는 탄닌을 효소를 이용하여 분해하면 맛, 향, 탁도 개선, 제품의 수율 및 품질 향상의 장점이 있다(Boadi1 & Neufeld 2001). 차의 쓴맛과 떫은맛을 주는 주요 카테킨 성

† Corresponding author: Byung-Sun Kang, Dept. of Eco-Friendly Horticulture, Cheonan Yonam College, Cheonan 330-709, Korea. Tel: +82-41-580-1063, Fax: +82-41-580-1248, E-mail: andrewkang@yonam.ac.kr

분은 epigallocatechin(EGC), catechin(C), epicatechin(EC), epigallocatechin gallate(EGCG), epicatechin gallate(ECG) 등으로 알려져 있다(Chun 2010). 이와 같은 카테킨류를 분해하는 tannase는 탄닌의 ester 결합을 가수분해하여 gallic acid와 glucose를 생성하는 효소로서, 세균류, 사상균류, 효모류 중에서 그 존재가 확인되고 있다(Battestin 등 2008; Bajpai & Patil 1997; Fernandez-Lorente 등 2011). 특히 *Aspergillus*, *Penicillium* 속 등의 곰팡이류에서 다량 생산되어 이용되고 있다. 차의 가공 과정 중에는 차 추출액 또는 농축액이 혼탁하게 되고, 침전이 발생하는 cream-down 현상이 발생하는데, 이는 카페인과 gallate형 카테킨, theaflavin 등의 복합체의 불용화에 의한(Ravichandran & Parthiban 1998).

따라서 본 연구에서는 제조 공정 및 품질에 단점을 발생시키는 녹차에 존재하는 탄닌을 효소분해법으로 분해시켜서 녹차 추출물의 떫은맛과 탄닌 함량을 감소시켜서 녹차 농축액의 품질 특성 증진과 건강기능성의 변화를 측정하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용한 녹차 추출 농축액(4.6 Brix%)은 보성에서 구입하여 사용하였다. 탄닌분해를 위해 *Aspergillus oryzae*에서 추출한 tannase(KTFH-60055, Kikkoman, Japan)를 사용하였으며, DPPH(1,1-diphenyl- β -picrylhydrazyl), (-)catechin, (-)epicatechin, (-)epicatechin gallate, (-)epi gallo catechin, (-)epi gallo catechin gallate 등의 시약은 Sigma사 특급시약을 사용하였다.

2. 효소 처리

녹차 농축액(5 mL)에 tannase 1 mL(≥ 500 U/g)를 첨가하여 40°C의 수조에서, 2시간 동안 반응 처리하였다. 효소 불활성화를 위해 5분간 100°C에서 가열하였으며, 효소처리하지 않은 시료를 비교구로 사용하였다.

3. pH 및 탁도 측정

추출물의 pH는 pH 측정기(UV-10, Denver Instrument Co., USA)를 사용하였다. 탁도는 효소처리 한 녹차 추출물과 효소처리하지 않은 녹차 추출물을 UV Spectrophotometer(UV-1201, Shimadzu, Japan)로 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 항산화 능력 측정

반응조건에 따라 제조된 추출물의 10배 희석액을 시료로서 사용하였다. 시료 0.2 mL에 적당량의 에탄올과 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 0.8 mL를 가하여 10초 동안 강하게

진탕한 후 10분 동안 방치하고, 525 nm에서 흡광도를 측정하여 백분율로 나타내었다.

$$\text{DPPH inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{\text{O.D. of sample}}{\text{O.D. of control}}\right) \times 100$$

5. 탄닌 정량 분석

탄닌 정량은 HPLC법을 사용하였다. 주요 탄닌 성분 중 녹차의 대표적 성분인 (-)catechin, (-)epi-catechin, (-)epi-catechin gallate, (-)epi gallo catechin, (-)epi-gallo catechin gallate를 분석하였다. 녹차 추출물의 탄닌 정량은 시료 10 mL에 chloroform 10 mL를 첨가하여 카페인을 제거하고, 시료층을 분리하여, ethylacetate 10 mL를 첨가 후 층을 분리하여, 여과한 후 Table 1과 같은 분석 조건으로 분석하였다.

6. 관능검사

효소 처리구와 효소 처리하지 않은 시료의 떫은맛 강도의 관능적 특성을 평가하기 위하여 15명의 훈련된 관능검사원(영동대학교 식품공학과 학생)에 녹차 추출물의 떫은맛을 30 mL씩 제공하여 5점 검사법으로 3회 반복 실시하였다. 떫은맛의 특성 차이는 1점 매우 약하다(very weak), 5점 매우 강하다(very strong)로 평가하였다. 결과는 T-test법으로 시료간의 유의적 차이를 검사($p < 0.05$)하였다.

결과 및 고찰

1. pH 및 탁도의 변화

pH는 효소처리 전 4.90 ± 0.06 , 처리 후 4.91 ± 0.07 로 유의적 차이가 없었으나, 탁도는 효소 무처리군은 1.38 ± 0.08 , 효소 처리군은 0.81 ± 0.02 로 맑아짐으로써 tannase에 의한 녹차의 청정 효과로 볼 수 있는 유의적 차이($p < 0.05$)를 나타내었다(Fig.

Table 1. HPLC conditions for tannin analysis

| Items | Conditions |
|------------------|---|
| Instrument | Waters Co., USA, 2695 |
| Column | Waters Xterra™ MS C ₁₈ 5 μ m(3.9×150 mm) |
| Mobilie phase | Solvent A: Acetonitrile: Ethyl Acetate: 0.05% H ₃ PO ₄ (12:2:86) Solvent B: Ethanol(99.5%) |
| Flow rate | 0.5 mL/min |
| Column temp. | 38°C |
| Detector | UV detector(Waters) |
| Injection volume | 10 μ l |
| Wavelength | 280 nm |

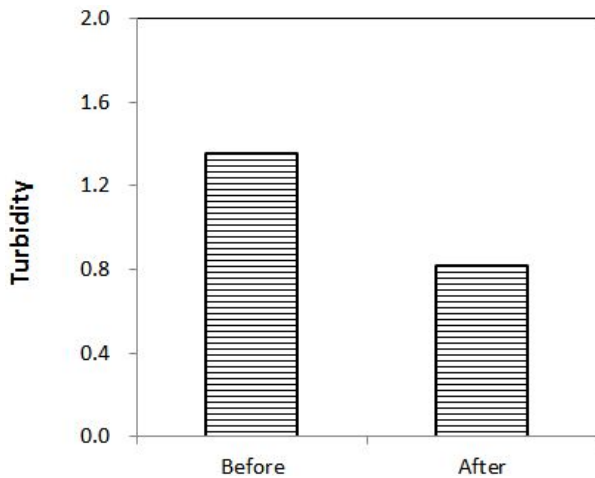


Fig. 1. Turbidity of green tea extracts treated with tannase.

1). Tannase는 홍차, 사과 주스, 와인 등의 청징을 위해 사용되고 있으며, 사과 주스의 경우에 젤라틴과 병용하는 것이 수개월 후에도 침전이나 혼탁이 발생하지 않는 것으로 보고되어 있다(Singh & Gupta 2004).

2. 항산화능의 변화

항산화능을 평가하는데 널리 이용되고 있는 DPPH 라디칼 소거능을 측정된 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 항산화 능력의 대조구로는 ascorbic acid(AA)를 이용하였으며, 녹차(GT), 녹차추출 농축액(GC), 탄닌분해효소 처리를 한 녹차 추출 농축액(GCT)의 항산화 능력을 측정을 하였다. Ascorbic acid와 녹차는 80% 이상의 항산화 능력이 있는 것으로 나타났으나, 녹차 농축액은 약 50% 정도로 나타났다. 차의 항산화능은 비교적 강한 소거작용을 나타내며, 녹차와 우롱차가 우수하였

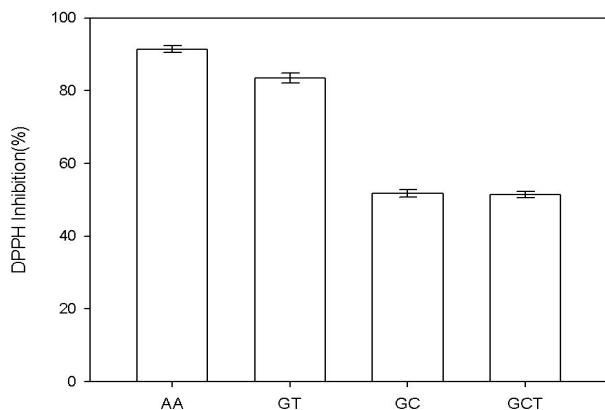


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of green tea concentrates. AA: ascorbic acid, GT: green tea, GC: green tea concentrates, GCT: green tea concentrates treated with tannase.

다는 보고도 있으나, 증발효차인 황차의 항산화능이 녹차나 홍차보다 높았다는 연구결과도 있다(Chung & Shin 2005; Park 등 2009). 홍차의 제조과정 중의 catechin, theaflavin 및 alkaloid의 변동을 조사한 결과, 발효과정 중에 EGCG, ECG, EGC, EC가 급격히 감소·변화한다고 보고(Choi SH 2009)되어 있기에 신선한 녹차보다도 녹차 농축액의 항산화능이 낮은 것은 제품의 제조 공정 중의 가열에 의해 항산화능이 감소되었다고 판단된다. 또한 녹차에 함유되어 있는 EGCG를 효소처리하여 EGC와 gallic acid로 분해하면 항산화능이 증가한다고 보고되어 있다(Battestin 등 2008). 이러한 항산화능은 EGC의 구조 중에 hydroxyl group의 증가에 의해 항산화능이 증가한다고 하였으나, 본 실험에서 녹차 농축액(GC)의 DPPH 측정값은 51.1 ± 0.95 이고, tannase 처리한 경우(GCT)는 51.8 ± 0.82 로 나타났으나, 유의차($p < 0.05$)가 없는 것으로 나타났다(Chung & Shin 2005; Macedo 등 2011).

3. 효소처리에 의한 탄닌의 변화

탄닌의 표준시료인 (-)-epi gallo catechin(EGC), (+)-catechin(C), (-)-epi catechin(EC), (-)-epi gallo catechin gallate(EGCG), (-)-epi catechin gallate(ECG)의 분석 결과는 Fig. 3과 Table 2에 나타내었다. EGC는 3.59분, C는 4.67분, EC는 5.64분, EGCG는 7.33분, ECG는 15.61분에 검출되었다.

유기농 녹차의 등급에 따른 총 카테킨 함량은 우전, 세작, 중작, 엽차, 대작의 순서로 감소하며, 채엽 시기가 녹차의 카테킨 성분 및 항산화능에도 영향을 미친다고 하였으며, 상급 녹차일수록 총페놀 및 카테킨 함량이 많으며, 또한 더 높은 항산화능을 가지는 것으로 보고되어 있다(Park 등 2009).

녹차의 카테킨류 함량은 채취 시기에 따라 미묘한 차이를 나타내며, EGCG는 5월경에 채취하는 우전 녹차가 가장 함량

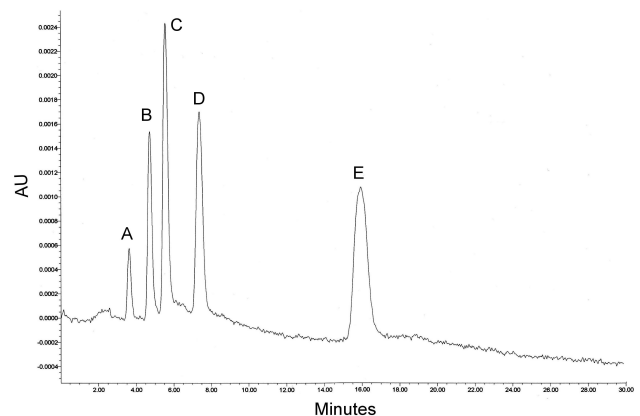


Fig. 3. HPLC standard patterns of tannins. A: (-)-epi gallo catechin, B: (+)-catechin, C: (-)-epi catechin, D: (-)-epi gallo catechin gallate, E: (-)-epi catechin gallate.

이 높다(Wee 등 1999; Song 등 2010).

Fig. 3은 tannase를 녹차 농축액에 작용시킨 결과, 효소 작용에 의해 홍차의 카테킨류가 분해되어 용해성이 증가되었으며, 효소의 농도가 높을수록 그 결과도 더욱 효과적이었던 연구결과와 동일하게 나타났다(Chandini 등 2011).

Table 2. Tannin contents of green tea concentrates

| | Tannin contents | | |
|------|-----------------|-------------------|---------------------------------|
| | Time | Green tea extract | Green tea extract using tannase |
| EGC | 3.59 | 15.4 | 14.2 |
| C | 4.67 | 6.0 | 2.9 |
| EC | 5.64 | 2.4 | 0.6 |
| EGCG | 7.33 | 4.8 | - |
| ECG | 15.61 | 7.6 | - |

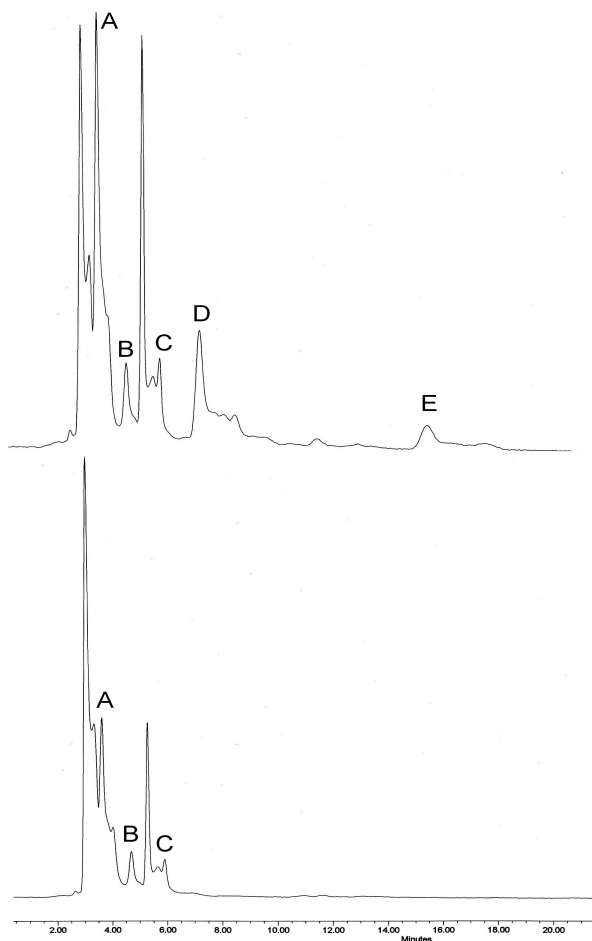


Fig. 4. HPLC patterns of green tea concentrates. A: (-)-epi gallo catechin, B: (+)-catechin, C: (-)-epi catechin, D: (-)-epi gallo catechin gallate, E: (-)-epi catechin gallate.

효소분해 전후의 녹차 농축액의 탄닌 함량 분석 결과는 Fig. 4와 Table 2에 나타내었다. EGCG와 ECG는 효소분해 후에는 peak가 사라졌는데, 이는 효소의 반응에 의한 결과로 판단된다.

EG, C, EGC는 효소에 의해 다소 분해된 것으로 나타났는데, 가장 떫은맛이 강한 EGCG가 완전히 분해되는 것으로 나타났다. 또한 tannase는 카테킨의 구조상에서 (-)EC 구조에 gallic acid가 ester 결합을 한 구조인 (-)ECG와 (-)EGCG는 esterase인 tannase에 의하여 가수분해되는 것으로 판단된다. 따라서 녹차를 효소 분해하게 되면 수용성 탄닌에 의해 발생하는 떫은맛이 크게 감소함을 알 수 있었다.

4. 관능검사

효소처리구와 처리하지 않은 녹차 추출물 떫은맛의 강도에 대한 특성 차이 검사에 대하여 관능검사를 실시한 결과는 Table 3과 같다.

떫은맛의 척도로 1점은 매우 약하다, 5점은 매우 진하다로 관능검사를 실시한 결과, 효소 처리 전의 시료가 사용 후의 시료에 대해 유의적으로 떫은맛이 강한 것으로 나타났다. 녹차의 탄닌 성분 중의 EGCG와 ECG가 tannase에 의하여 분해되어 비교적 온화한 떫은맛을 나타내는 EGC와 EC로 전환되어 녹차 농축액의 떫은맛이 크게 감소한 것으로 나타났다(Chung & Shin 2005).

요 약

녹차 농축액을 탄닌 가수분해 효소를 이용하여 가수 분해한 후 기존 녹차 농축액과 비교하여 이화학 및 관능적 검사를 실시하였다. pH, 항산화 능력은 효소분해 전후 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 효소 분해 후 탁도는 유의적으로 더욱 맑아졌다. 녹차 탄닌의 주성분인 카테킨류는 탄닌분해 효소에 의해 분해되어 전체적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 갈레이트형 카테킨 성분인 에피갈로카테킨 갈레이트(EGCG)와 에피카테킨 갈레이트(ECG)는 EGC와 EC 그리고 gallic acid로 효소 분해되어 효소처리 녹차 농축액에서는 EGCG와 ECG가 측정되지 않았다. 떫은맛의 관능검사는 효소분해 후 유의적으로 떫은맛의 감소가 발생하였다. 따라서 탄닌분해

Table 3. Quality difference test of green tea concentrates

| | Intensity of astringent taste | |
|---------------|-------------------------------|---|
| | Green tea concentrates | Green tea concentrates treated with tannase |
| Sensory score | 4.6 | 1.6* |

* $p > 0.05$.

효소를 이용하여 녹차 추출물을 분해하면 녹차액은 맑아지지만, 기존 녹차 추출물의 문제점인 떫은맛은 감소되어 다양한 식품에 응용할 수 있는 것으로 나타났다.

참고문헌

- Bajpai B, Patil S. 1997. Induction of tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity in some members of fungi imperfecti. *Enzyme & Microbial Tech* 20:612-614
- Bang BH, Park HH. 2000. Preparation of yogurt added with green tea and mugwort tea and quality characteristics. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29:854-859
- Battestin V, Macedo GA, De Freitas VAP. 2008. Hydrolysis of epigallocatechin gallate using a tannase from *Paecilomyces variotii*. *Food Chem* 108:228-233
- Boadi DK, Neufeld RJ. 2001. Encapsulation of tannase for the hydrolysis of tea tannins. *Enzyme & Microbial Tech* 28:590-595
- Chandini SK, Rao LR, Gowthaman MK, Haware DJ, Subramanian R. 2011. Enzymatic treatment to improve the quality of black tea extracts. *Food Chem* 127:1039-1045
- Choi SH. 2009. Changes in the composition of catechins, theaflavins and alkaloids in leaves from Korean yabukida tea plant during processing to fermented black tea. *Korean J Food Culture* 24:308-314
- Choi Y, Lee SM, Hwang IG, Jeong HS, Lee J. 2011. Changes in antioxidant activity of duck egg after pressurized soaking in green tea extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40:1328-1332
- Chun JU. 2010. Rapid measure of color and catechins contents in processed teas using NIRS. *Korean J Plant Res* 23: 386-392
- Chung YH, Shin MK. 2005. A study on the physicochemical properties of Korean teas according to degree of fermentation. *Korean J Food & Nutr* 18:94-101
- Fernandez-Lorente G, Bolivar JM, Rocha-Martin J, Curiel JA, Munoz R, de las Rivas B, Carrascosa AV, Guisan JM. 2011. Synthesis of propyl gallate by transesterification of tannic acid in aqueous media catalysed by immobilised derivatives of tannase from *Lactobacillus plantarum*. *Food Chem* 128: 214-217
- Gu LW, Kelm MA, Hammerstone JF, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Prior RL. 2003. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *J Agri & Food Chem* 51:7513-7521
- Macedo JA, Battestin V, Ribeiro ML, Macedo GA. 2011. Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. *Food Chem* 126:491-497
- Park KR, Lee SG, Nam TG, Kim YJ, Kim YR, Kim DO. 2009. Comparative analysis of catechins and antioxidant capacity in various grades of organic green teas grown in Boseong. *Korean J Food Sci Technol* 41:82-86
- Ravichandran R, Parthiban R. 1998. Changes in enzyme activities (polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase) with type of tea leaf and during black tea manufacture and the effect of enzyme supplementation of dhoool on black tea quality. *Food Chem* 62:277-281
- Rodriguez H, Rivas B, Gomez-Cordoves C, Munoz R. 2008. Degradation of tannic acid by cell-free extracts of *Lactobacillus plantarum*. *Food Chem* 107:664-670
- Singh S, Gupta R. 2004. Apple juice clarification using fungal pectinolytic enzyme and gelatin. *Indian J of Biotech* 3: 573-574
- Song KJ, Beak DC, Kim YW, Kim YG, Lee MS, Lee SP, Kim CS. 2010. Catechin and caffeine concentration variations in Jeju green tea varieties harvested over a seven-month period. *J Food Sci Nutr* 15:229-232
- Sung NY, Kweon SY, Park JN, Choi JI, Song BS, Kim, JK, Lee JW, Kim JH. 2011. Effect of Yukwa containing green tea powder on lipid composition and body weight change in mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40:17-182
- Wee JH, Moon JH, Park KH. 1999. Catechin content and composition of domestic tea leaves at different plucking time. *Korean J Food Sci Technol* 31:20-23

접 수 : 2011년 11월 15일
 최종수정 : 2011년 12월 14일
 채 택 : 2011년 12월 20일