

Original Article

Chelation of Tannin from Sorghum Extract using Fe(II)

Yang Sook Jung, Hyo Sik Seo and Do Gyu Bae*

Department of Bio-fibers and Materials Science, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

수수 타닌의 Fe(II) 킬레이트

정양숙 · 서효식 · 배도규*

경북대학교 바이오섬유소재학과

Received: January 21 2015 / Revised: April 6 2015 / Accepted: April 7 2015

Abstract This study investigated the chelation of a sorghum bran extract using iron (Fe) as a new natural colorant. The composition of the sorghum bran extract and chelation conditions were both examined. The thermal properties of the chelated colorants were analyzed using differential scanning calorimetry (DSC) and a thermal analyzer system(TGA). The sorghum bran extract solution showed a maximum absorbance at 281 nm based on UV/Vis spectrophotometry. According to the chelation pH conditions, pH 7.5 was the most effective. The chelation of the sorghum bran extract increased rapidly when increasing the iron concentration up to 2 mg/L, with no further chelation at a higher concentration. The particle size distribution curve for the chelated tannin revealed four groups: 4.5~17 μm , 20~42 μm , 45~80 μm , and 83~160 μm . In a DSC analysis, endothermic peaks attributed to the pyrolysis of the extract and chelated tannin were found at 318°C and 415°C, respectively. In a TGA analysis, the chelation was shown to increase the final degradation temperature from 253°C to 382°C, confirming that the chelation improved the thermal stability.

Key words: Chelation, Sorghum, Tannin, DSC, TGA

서론

최근 합성색소의 유해성이 끊임없이 제기되면서 천연의 원료로부터 얻어지는 천연색소의 개발에 대한 관심이 커지고 있다. 천연색소가 재조명을 받고 있는 시점에서 바람직한 추구 방향은 환경적 측면을 고려하면서 지속 가능한 천연색소의 공급과 열, 빛 및 pH 등의 환경 요인에 의해 안정성이 떨어지는 단점을 극복해 나가야 한다.

천연색소의 산업화를 위해서는 우수한 색소 자원의 탐색과 이용에 대한 많은 연구가 필요하다. 한 가지 예를 들면 농산물의 생산과정이나 수확 후에 버려지는 부산물 중 대량으로 공급이 가능하며 천연색소로서 이용 가능성이 높은 것들을 발굴하여 이용하는 것이다.

식물색소 자원 중에서 활용 가능한 페놀성 물질인 타닌류(가수분해형과 축합형)는 식물체에 널리 분포되어 있는 2차 대사물의 하나로써 다양한 구조와 분자량을 가지며(Salunkhe et al., 1982) 식물체에 특수한 색을 부여하고 안토시아닌과 마찬가지로 여러 가지 금속이온과 염을 형성하면 그 색깔은 회색, 갈색, 흑청색, 청록색 등을 띄게 된다. 이전 연구들에서는 주로 사탕수수, 콩과 식물, 수수의 씨앗에서 특정 색소로서 페놀성 화합물에 대한 연구가 주를 이루어 왔다(Deshpande et al., 1984). 주요 곡류들 중에서 수수는 타닌함량이 많은 작물로 품종에 따라 0.18%~3.4%의 범위로 상당히 높다(Grmmmer et al., 1992). 이(Rhee et al., 1983) 등은 수수씨 껍질로부터 sorghum pigment의 추출 연구에서 물과 에틸 알코올의 혼합 용매로 색소를 추출 할 때의 추출시간, 온도, 용매량과 알코올 농도와의 상관관계식을 규명하였으며, 수수의 색소추출과 염색성에 관한 연구(Strumeyer and Malin, 1975; Rhee and

*Corresponding author: Do Gyu Bae
Tel: 82-53-950-5742; Fax: 82-53-950-6744
E-mail: dkbae@knu.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2015 Institute of Agricultural Science and Technology, Kyungpook National University

Kang, 1977; Lee and Cho, 1978; Woo et al., 2010)로서는 색소가 비교적 많이 포함된 수수씨 껍질에 대하여 주로 연구되어 왔지만 대규모 산업용으로 활용되기에는 다소 제한이 있을 수 있다. 그러므로 수수의 도정 공정에서 대량 발생하여 손쉽게 구할 수 있고 비용면에서도 저렴하여 타닌의 새로운 자원이 될 수 있는 수수 등겨의 이용이 효과적일 것이다.

대량의 수수 등겨에 존재하는 타닌을 추출, 분리하여 사용할 수 있다면 천연 색소로서의 가치뿐만 아니라 이용도 증진 면에서도 그 활용성이 대단히 클 것으로 생각된다. 타닌 색소는 많은 식물체에 광범위하게 존재하지만 천연 색소원으로서 산업화하기 위해서는 추출의 용이성 및 고효율성과 안정성이 등이 필수적으로 요구되며 대규모의 안정적 원료공급 또한 중요하다.

본 연구에서는 수수 등겨에 함유되어 있는 타닌의 천연색소로의 활용 가능성을 알아보기 위해서 먼저 추출물의 성분 특성을 조사한 후 Fe와의 킬레이트화 반응을 통해 킬레이트 조건을 확립하고 킬레이트 된 색소의 여러가지 특성에 대해 조사되었다.

재료 및 방법

시험재료

실험에 사용된 시료는 수수의 도정과정에서 분리되는 bran으로서 SIEVE(Aperture 850 μ m)로 큰 분순물을 제거한 후 사용하였다.

본 연구에 사용된 시약은 특급이상의 것을 사용하였다.

Ammonium Molybdate Tetrahydrate (Oriental Chemical Co., Ltd)

Catechin(+) (Sigma-Aldrich Co., Ltd)

Ciric acid (DUSAN pure Chemical Co., Ltd)

Cupric sulfate pentahydrate(Daejung Chemical Co., Ltd)

Disodium hydrogen arsenate heptahydrate (Junsei Chemical Co., Ltd)

Folin-Denis reagent (Sigma-Aldrich Co., Ltd)

Glucose(Dextrose, Anhydrous) (DUSAN pure Chemical Co., Ltd)

Hydrochloric Acid (DC Chemical Co., Ltd)

Iron(II) sulfate (DUSAN pure Chemical Co., Ltd)

Potassium Sodium Tartrate (Junsei Chemical Co., Ltd)

Sodium Bicarbonate (DUSAN pure Chemical Co., Ltd)

Sodium Carbonate, Anhydrous (Oriental Chemical Co., Ltd)

Sodium Hydroxide (DUSAN pure Chemical Co., Ltd)

Sodium Oxalate (DC Chemical Co., Ltd)

Sodium sulfate, anhydrous (KISHIDA CHEMICALS CO., Ltd)

Tannic acid (Samchun Chemical Co., Ltd)

Vanillin (Sigma-Aldrich Co., Ltd)

Zinc Acetate (SHINYO PURE CHEMICALS CO., LTD)

타닌 추출방법

불순물이 제거된 bran을 액비 1:100에서 추출온도 및 시간을

40°C와 24시간으로 하여 추출한 후 10분간 25,000 rpm으로 원심분리(vs-30000i, 비전과학, 한국)하고 상등액을 취하여 사용하였다. 상등액은 포화중성 초산연용액을 가하여 단백질을 침전시킨 후, 여과지로 여과하여 단백질을 제거한 후 여과액에 무수수산나트륨 분말을 가하여 남아 있는 아연을 수산연으로 침전시킨 후 여과지로 여과한 후 시료액으로 사용하였다.

분석용 시료는 spray drier (inlet and outlet temp. of 110 and 75°C, air pressure of 1.5 kgf/cm² and pump speed of 4 L/h) (Eyela, SD-1000, Japan)를 사용하여 분말화하여 사용하였다.

흡광 스펙트럼

수수 추출물의 타닌 성분 확인을 위하여 UV/Vis 분광광도계 (spectrophotometer, U-2800, Hitachi, Japan)를 사용하여 측정하였다.

수수추출물의 성분 분석

(1) 총페놀의 함량 분석법

총페놀 함량 분석에 널리 이용되고 있는 Folin-Denis법(Nacz and Shahidi, 1989)을 사용하여 분광광도계(spectrophotometer, U-2800, Hitachi, Japan)를 사용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 타닌산을 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 mg/tannic acid 당량으로 환산하였다.

(2) 축합형 타닌의 함량 분석법

축합형 타닌 함량 분석에 널리 이용되고 있는 modified-vanillin 법(Price et al., 1978)을 사용하여 분광광도계(spectrophotometer, U-2800, Hitachi, Japan)로 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 catechin을 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 mg/tannic acid 당량으로 환산하였다.

(3) 당 함량 분석법

탄수화물을 정량하는 방법은 여러 가지가 있는데 그 중 환원당의 정량법으로는 Somogyi-Nelson법(Nelson, 1944)이 사용되었으며, 비환원당의 정량법은 가수분해와 같은 전처리를 행한 후에 환원당과 같은 방법으로 측정하여 계산하였다.

측정된 흡광도는 Glucose를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 mg/glucose 당량으로 환산하였다.

(4) 단백질 정량 분석법

단백질 정량을 위해서 원소 분석기(Elemental Analyzer, Flash 2000, Thermofisher, Italy)를 이용하여 질소 함량을 측정하였다. 단백질이 평균 16%가량의 질소를 포함하고 있어 1 mg의 질소는 6.25 mg의 단백질이라 볼 수 있다. 따라서 원소 분석으로 측정된 질소의 값으로 단백질 함량을 정량하는 방법(AOAC Official method, 2001)을 사용하여 분석하였다.

(5) 수분 함량 분석법

분말 시료의 수분함량을 측정하기 위해 수분측정저울(CH/XM60, Precisa, Swiss)을 사용하였다.

수수 타닌의 킬레이트화

(1) pH에 따른 킬레이트화

타닌 추출방법을 통해 만들어진 시료액을 사용하여, citric acid와 sodium carbonate로 pH를 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5로 조정하였다. 2시간동안 실온에서 반응시킨 후 파장 546 nm에서 흡광도를 측정하여 킬레이트화 반응 정도의 척도로 사용하였다.

(2) Fe 농도에 따른 킬레이트화

pH를 7.5로 고정 시킨 후 FeSO₄ 농도를 0.1~10 mg/L로 조정하여 실온에서 반응시킨 후 킬레이트화 반응의 정도를 위와 같은 방법으로 확인하였다.

입자크기 분석

킬레이트화 된 타닌의 입자 크기는 입자크기분석기(Particle size analyzer, N5/LS-13320, Beckman Coulter, USA)를 사용하여 측정하였다.

열적 성질 분석

킬레이트화 된 타닌의 열적 성질을 알아보기 위해 질소 기류 하에서 DSC(DSC Q2000 V24.4 Build 116, TA Instruments, Japan)는 30~450°C에서, TGA(Thermal analyzer system, Q600, TA Instruments, Japan)는 30~700°C에서 각각 승온 속도는 10°C/min. 으로 하여 온도에 따른 thermogram을 얻었다.

결과 및 고찰

수수 추출물의 UV/Vis spectrum

Figure 1은 수수로부터 추출된 수용액의 흡수 스펙트럼으로서 자외선 영역인 281 nm에서 최대 흡수 peak를 보여주고 있다. 이는 수수에 다량으로 함유되어 있는 타닌(Price, 1978)에 의한 것으로 사료된다. 일반적으로 식물의 추출액 중에 포함되어 있는 타닌의 최대흡수파장은 272~285 nm의 범위에 있는 것으로 알려져 있으며(da Silval and Taylor, 2004), 특히 축합형 타닌으로 알려져 있는 호두외피(Amarowicz et al., 2005), 빈랑(Bae, 2004) 그리고 아선약(Nam and Lee, 2010)은 각각 270 nm, 278.5 nm, 280 nm에서 최대흡수 peak가 나타난다고 하였다.

수수 추출물의 성분 분석

Table 1은 수수의 총페놀성 물질과 그 중 축합형 타닌의 함량을 측정한 결과로 총페놀성 물질의 함량은 364 mg±3, 축합형 타닌의 함량은 263 mg±3이었다. 환원당 함량은 116 mg±3, 비환원당은 131 mg±3으로 당의 함량 또한 많음을 알 수 있었다. 질소의 함량을 측정하여 구한 단백질 함량은 85.6 mg이였으며 수분은 61.9 mg으로 나타났다.

pH에 따른 킬레이트화

Fe는 타닌과 반응하여 진회색의 착화합물을 만든다. 이러한 색의 변화로 수수 타닌과 Fe의 킬레이트화 반응 유무와 정도를

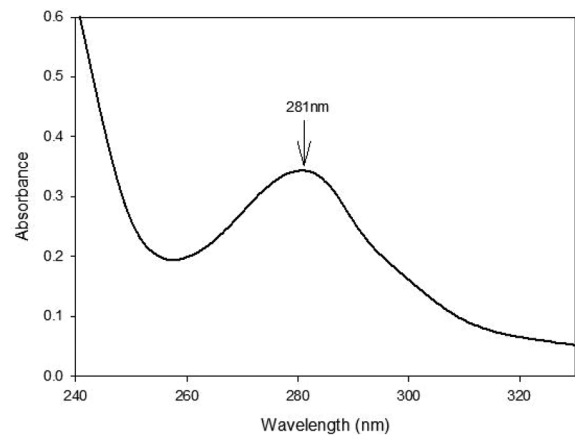


Figure 1. UV/Vis spectrum of sorghum tannin.

Table 1. Components of Sorghum extract (mg/1g)

Total phenolics (mg TAE ¹⁾ /g)	364
(Condensed tannin (mg CE ²⁾ /g)	263)
Reducing sugar (mg GE ³⁾ /g)	116
Non-reducing sugar (mg GE ³⁾ /g)	131
Protein (mgN ⁴⁾ /g)	86
Water	62
Others	241

¹⁾Tannic acid equivalents.

²⁾Catechin equivalents.

³⁾Glucose equivalents.

⁴⁾Nitrogen equivalents.

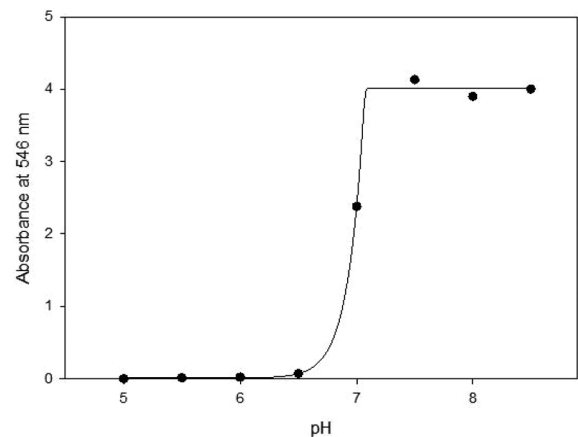


Figure 2. Effect of pH on chelation of Fe and Sorghum tannin.

확인하였다.

Figure 2에서 보는 바와 같이 pH 5-6.5 범위에서는 킬레이트화 반응이 거의 확인되지 않았으며, pH 7 이상에서는 흡광도 값이 증가하여 pH 7.5에서 최고로 나타났으며 그 이상에서는 약간 감소하는 경향으로 나타나 적절한 킬레이트화 반응의 pH는 7.5로 확인되었다.

FeSO₄ 농도에 따른 킬레이트화

Figure 3은 Fe 농도 변화에 따른 킬레이트화 정도를 나타낸

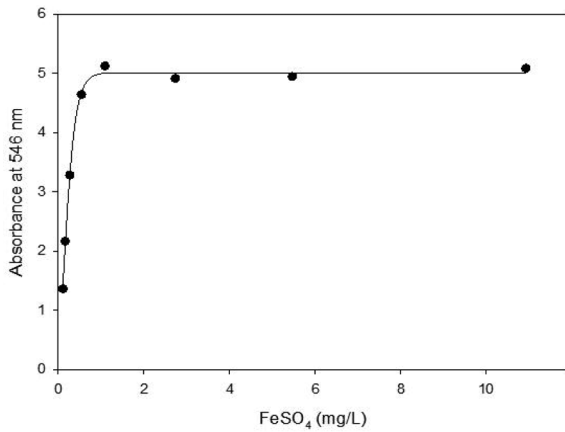


Figure 3. Effect of FeSO₄ concentration on chelation of Fe and Sorghum tannin at pH 7.5.

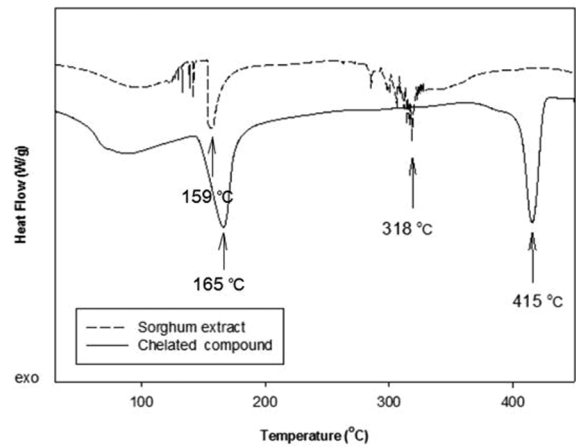


Figure 5. DSC thermograms of Sorghum extracts.

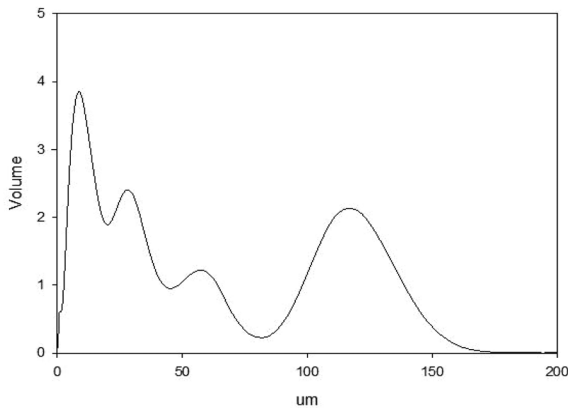


Figure 4. Particle sizes of chelated sorghum tannin in solution.

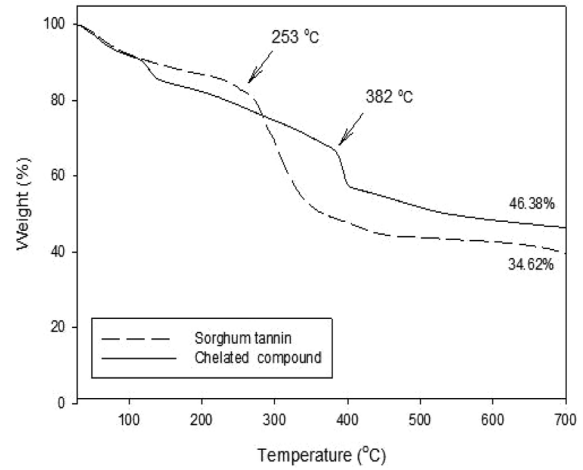


Figure 6. TGA thermograms of Sorghum extracts.

그림으로서, 2 mg/L까지는 킬레이트화 반응이 급격히 증가하나, 그 이상의 농도에서는 더 이상의 추가적인 킬레이트화 반응은 없는 것으로 보인다.

입자크기분석

킬레이트 반응 후 용액 속에 있는 타닌 색소의 입자크기를 입자크기분석기를 통해 분석한 결과를 Figure 4에 나타내었다. 킬레이트화 한 타닌 색소는 다양한 크기로 구성되어 있어, 킬레이트 반응 후 입자 크기는 4.5~17 μm, 20~42 μm, 45~80 μm, 83~160 μm 범위의 네 그룹으로 나누어지는 것을 확인 할 수 있었다.

킬레이트화 된 타닌의 열적 성질 분석

Figure 5는 수수 타닌의 DSC 열적거동을 나타낸 그림으로서 타닌의 킬레이트화에 의해 열분해에 기인한 흡열 peak가 크게 증가(318°C → 415°C)한다는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과는 킬레이트화 반응에 의해 열 안정성이 향상된다는 것을 의미하는 것으로 이에 따라 보다 넓은 분야에 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

Figure 6에서 보는 바와 같이 수수 타닌은 253°C부터 열분해 반응에 기인한 급격한 무게 감소를 보여주고 있다. 한편 킬레이트화 수수 타닌의 경우 117°C에서부터 해중합에 기인

한 것으로 고려되는 무게 감소를 보이며, 승온에 따른 무게 감소는 280°C까지는 수수 타닌보다 오히려 더 큰 폭으로 무게 감소를 보여주고 있다. 킬레이트화 수수의 주된 열분해 온도는 382°C에서 일어남을 알 수 있으며, 열분해 후 남은 양은 46.38%로 킬레이트화 전의 수수 타닌에서(34.62%)에서 보다 많이 남아있는 것을 확인할 수 있었다. DSC와 TGA 분석을 통해 킬레이트화는 열 안정성을 향상시킨다는 것을 확인하였다.

요 약

본 연구에서는 수수 등겨에 함유되어 있는 타닌의 새로운 천연 색소자원으로서의 활용 가능성을 알아보기 위해서 추출된 색소의 성분을 조사하였으며, Fe와의 킬레이트 반응 조건과 킬레이트화 색소에 대한 여러 가지 특성이 조사되었다.

수수 등겨로부터 추출된 수용액의 흡수 스펙트럼에서는 자외선 영역인 281 nm에서 타닌에 의한 최대 흡수 peak를 보여주고 있다. pH 조건에 따른 킬레이트화 반응에서는 pH 7.5의

반응 조건이 가장 효과적이었다. Fe 농도 2 mg/L까지는 킬레이트화 반응이 급격히 증가하나, 그 이상의 농도에서는 더 이상의 추가적인 킬레이트화는 없는 것으로 나타났다

킬레이트화 된 타닌 색소의 입자 크기는 4.5~17 μm , 20~42 μm , 45~80 μm , 83~160 μm 범위의 네 그룹으로 나누어지는 것을 확인 할 수 있었다. DSC 분석에서는 타닌의 킬레이트화에 따라 열분해에 기인한 흡열 peak가 크게 증가 (318°C → 415°C)한다는 것을 확인 할 수 있었으며, TGA 분석에서도 열분해 시작 온도가 253°C에서 382°C까지 상승하는 것을 알 수 있어, 킬레이트화는 열 안정성을 향상시킨다는 것을 확인하였다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 및 교육과학기술부 대구경북과학기술원 공동연구과제로 수행중인 나노바이오 융합기술을 이용한 유색 미수수 천연색소 실용화 연구(PJ00920403201301)에서 나온 결과물입니다.

References

- Salunkhe DK, Jadhav SJ, Kadam SS, Chavan JK (1982) Chemical, biochemical and biological significance of polyphenols in cereals and legumes. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 17: 277-305.
- Deshpande SS, Sathe SK, Salunkhe DK (1984) Chemistry and safety of plant polyphenols. In M. Friedman (Ed.), *Nutritional and toxicological aspects of food safety*, New York, NY: Plenum Press, pp. 457-467.
- Gmmer HR, Parbhoo V, Mcgrath RM (1992) Antimutagenicity of polyphenol-rich fractions from sorghum bicolor grain. *J Sci Food Agric* 59: 255-256.
- Rhee JM, Kim CK, Kim GJ (1983) A study on natural dyes (III)- the extraction of sorghum pigment from the husk of sorghum seed. *Text Sci Eng* 20: 151-157.
- Strumeyer DH, Malin MJ (1975) Condensed tannin in grain sorghum. *J Agric Food Chem* 23: 909-914.
- Rhee JM, Kang YE (1977) A study on natural dyes (II)- the color alteration of sorghum pigment due to light fading. I *Technol Sci* 9: 161-166.
- Lee JH, Cho SH (1978) A study on utilization of the sorghum pigment. I *Technol Sci* 4: 15-20.
- Woo KS, Seo MC, Kang JR, Ko JY, Song SB, Lee JS, Oh BG, Park GD, Lee YH, Nam MH, Jeo HS (2010) Antioxidant compounds and antioxidant activities of the methanolic extracts from milling fractions of sorghum (*sorghum bicolor* L. moench). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1695-1699.
- Nacz M, Shahidi F (1989) The effect of methanol-ammonia-water treatment on the content of phenolic acids of canola. *Food Chem* 31: 159-164.
- Price ML, Scoyoc SV, Butler LG (1978) A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J Agric Food Chem* 26: 1214-1218.
- Nelson N (1944) A photometric adaption of Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem* 153: 375-379.
- AOAC Official method (2001) Protein (crude) in animal feed, forage (plant tissue), grain, and oilseeds block digestion method using copper catalyst and steam distillation into boric acid.
- da Silval L, Taylor J (2004) Sorghum bran as a potential source of kafiri. *Cereal Chem* 81: 322-327
- Amarowicz R, Troszynska A, Shahidi F (2005) Antioxidant activity of almond seed extract and its fractions. *J Food Lipids* 12: 344-358.
- Bae SJ (2004) Dyeability and functional characteristics of arecae semen extract. *Fam Environ Res* 42: 63-72.
- Nam KY, Lee JS (2010) Dyeability and functionality of catechu(part I)-characteristics of catechu and dyeing properties of cotton-. *J Korean living Sci association* 19: 699-707.