

탄수화물 가수분해효소 처리가 옥수수 가루의 페놀산과 항산화활성에 미치는 영향

조동화¹ · 김미정² · 심은영¹ · 전용희¹ · 이춘기¹ · 우관식^{1,*}

¹농촌진흥청 국립식량과학원 중부작물부, ²농촌진흥청 연구정책국

Effect of carbohydrase treatments on phenolics content and antioxidant activity of maize flour

Dong-Hwa Cho¹, Mi Jung Kim², Eun-Yeong Sim¹, Yong Hee Jeon¹, Choon Ki Lee¹, and Koan Sik Woo^{1,*}

¹Department of Central Area Crop Science, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration

²Research Policy Bureau, Rural Development Administration

Abstract Enzymatic treatments of maize flour (MF) were investigated using commercial carbohydrases (Ultraflo L and Pentopan 500 BG) to enhance the phenolic acid content and antioxidant property. The total phenolic acid content of the MF was 3.76 mg/100 g, whereas those of the Pentopan 500 BG and Ultraflo L treated MF were 6.85 and 39.55 mg/100 g, respectively. Particularly, ferulic acid content of Pentopan 500 BG-treated MF was 20.0 times higher than that of untreated MF (1.7 vs. 33.9 mg/100 g). Pentopan 500 BG appeared to be more effective than Ultraflo L in increasing the free phenolic acid content. Antioxidant activities of enzyme treated MF were significantly higher than untreated MF. In particular, the Pentopan 500 BG-treated MF (16.0 mmol TE/100 g) was approximately 1.5 times higher than untreated MF (12.6 mmol TE/100 g). Enzymatic hydrolysis of cell wall polysaccharides in MF could be used as an effective procedure for not only increasing phenolic content but also antioxidant activities.

Keywords: maize flour, carbohydrase, pentopan, phenolic compounds, antioxidant properties

서 론

옥수수(*Zea mays*)는 쌀, 밀과 함께 세계에서 가장 많이 생산되는 식량 작물 중 하나이다. 쌀과 밀이 주로 식용으로 이용되는 것과 대조적으로 옥수수는 식용뿐만 아니라 사료용, 종실용, 사일리지용 등 다양하게 이용되고 있으며 우리나라 전역에서 재배가 가능하다(Lee 등, 2016). 또한 최근에는 옥수수를 바이오 연료(bio-fuel)의 주원료로 활용하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있어, 다른 두 곡류에 비해 이용 범위가 넓다고 할 수 있다.

페놀산(phenolic acid)은 펜토스 인산대사 경로(pentose phosphate pathway), 시킴산 경로(shikimate pathway), 페닐프로파노이드 경로(phenylpropanoid pathway)에 의해 생성되는 이차 대사산물(secondary metabolites)이다. 이들 대부분은 benzoic acid와 cinnamic acid에 하나 이상의 치환기를 가지고 있는 형태의 화합물로 식물체의 병원체, 곤충 등에 대한 방어에서 중요한 역할을 한다(Balasundram 등, 2006). 옥수수를 비롯한 다양한 전곡류에 다량 존재하는 페놀산은 항산화, 항염증, 항당뇨, 항비만, 항암, 심혈관 질환 예방 등 다양한 생리활성을 가지고 있다. 이들은 다른 화

합물과의 결합 유무에 따라 유리 페놀산(free phenolic acid), 공액 페놀산(conjugated phenolic acid), 불용성 페놀산(bound phenolic acid)으로 분류한다. 불용성 페놀산은 주로 식물 세포벽의 구성성분과 에스터 결합(ester bond)을 하고 있다. 공액 페놀산은 불용성 페놀산과 같이 다른 화합물과 결합하고 있는 형태지만, 분자량이 작아서 물에 녹을 수 있는 형태이며, 유리 페놀산은 다른 화합물과 결합하지 않은 순수한 형태의 페놀산을 의미한다. 유리 페놀산은 불용성 페놀산보다 체내 흡수율이 높으며 생리활성이 강한 것으로 보고되고 있다(Chandrasekara와 Shahidi, 2011).

옥수수의 페놀산은 대부분 불용성 형태로 존재하는데, Acosta-Estrada 등(2014)은 옥수수, 현미, 통밀, 귀리, 보리 등의 곡류에서 불용성 페놀 화합물이 차지하는 비율은 전체 페놀 화합물의 70% 이상이라고 하였다. 또한 Lopez-Martinez 등(2009)은 18종의 옥수수의 페놀산 함량을 조사한 결과, 페놀화합물의 77-82%가 불용성 형태로 존재한다고 하였다. 옥수수에는 ferulic acid, *p*-coumaric acid, sinapic acid, diferulic acid 등 다양한 페놀산이 있으며, 이들 대부분은 과피에서 ferulic acid 형태로 존재한다(Chiremba 등, 2012). Adom과 Liu(2002)는 옥수수에서 수용성 ferulic acid의 대부분은 작은 당들과 결합한 형태(conjugated form)로 존재하며, 수용성 ferulic acid의 오직 10%만이 유리 ferulic acid으로 존재한다고 하였다. 과피는 옥수수 종자의 최외측에 형성된 세포층으로 배와 배유와 함께 옥수수 종자를 구성하는 중요한 부위 중 하나이며, 페놀산은 주로 과피의 arabinoxylan과 결합하고 있다(Yadav 등, 2007). 하지만 불용성 페놀산의 생리활성은 유리 형태(free form)보다 낮기 때문에, 불용성 페놀산을 유리 형태로 전환할 수 있다면 옥수수 가루를 주원료로 하는 가공식품의 생리활성을 높

*Corresponding author: Koan Sik Woo, Department of Central Area Crop Science, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Suwon 16429, Korea
Tel: +82-31-695-0616
Fax: +82-31-695-4085
E-mail: wooks@korea.kr
Received November 30, 2017; revised January 1, 2018;
accepted January 3, 2018

일 수 있을 것이다.

식물의 식이섬유는 셀룰로스(cellulose), 헤미셀룰로스(hemicellulose), 리그닌(lignin) 등으로 구성되어 있는데, 사람은 이들을 분해할 수 있는 탄수화물 가수분해효소가 없기 때문에 식이섬유 및 이들과 결합하고 있는 불용성 페놀산의 소화 및 흡수가 힘들다. 탄수화물 가수분해효소는 탄수화물을 단순당으로 가수분해할 수 있는 효소의 총칭으로, amylase, cellulase, β -glucanase, hemicellulase, xylanase, arabanase 등이 있다. 이들은 곡류와 곡류 부산물의 단백질, 단순당, 페놀산 등의 추출 효율을 높여줄 뿐 만 아니라 2차 가공품(식빵, 쿠키)의 제품 특성도 향상시킬 수 있다 (Hourigan과 Chesterman, 1997; Hanmoungjai 등, 2002). 또한 탄수화물 분해효소 처리는 식이섬유와 결합하고 있는 불용성 페놀산을 유리 형태로 전환시켜주며 곡류의 건강 기능성을 증진시켜 줄 것으로 예상되나 이에 대한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 탄수화물 가수분해효소를 옥수수 가루에 처리함으로써 옥수수 가루의 기능성을 높이고자 하였으며, 이를 위하여 환원당과 페놀산 함량, 항산화활성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에는 2016년 농촌진흥청 국립식량과학원에서 재배 및 수확된 광평옥(*Zea mays* L. cv. Kwangpyeongok)을 사용하였다. 옥수수는 낱알을 분리한 후 깨끗이 수세하고 40°C에서 24시간 동안 열풍 건조하였다. 건조가 완료된 시료는 분쇄 후 100 mesh (pore size 150 μ m)에 통과시켜 일정 크기의 가루를 얻었으며, 이때 체를 통과하지 않은 시료는 다시 분쇄 및 체로 치는 과정을 반복하였다. 탄수화물 가수분해효소 Pentopan 500 BG (Endo-1-4- β -xylanase from *Thermomyces lanuginosus*)와 Ultraflo L (heat stable multi-active β -glucanase)는 Novozyme (Bagsvaerd, Denmark)에서 구입하여 사용하였다. 사용한 효소의 주요 효소와 소스, 최적 반응조건은 Table 1에 나타내었다.

탄수화물 가수분해효소(carbohydrase) 처리

옥수수 가루 15 g (dry basis)과 100 μ L 탄수화물 가수분해효소 (Table 1)와 10 mL sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.5)를 밀폐된 용기에 넣고 완전히 섞어준다. 이후 이를 진탕항온수조(40°C, 16시간, 150 rpm)에서 반응시키고 열풍건조(50°C, 8시간)하였다. 건조가 완료된 시료는 막자사발로 갈고 100 mesh (pore size 150 μ m)에 통과시켜 일정 크기 이하의 옥수수 가루를 얻었다.

옥수수 가루의 환원당 함량 분석

환원당은 Miller(1959)의 dinitrosalicylic acid (DNS)법을 일부 수정하여 측정하였다. 옥수수 가루 1 g에 증류수 10 mL을 가하고 진탕 항온수조(35°C, 10분, 150 rpm)에서 환원당을 추출한 후 원심분리(10,000 \times g, 10분, 4°C)하여 상층액만 얻었다. 상층액 1 mL

을 DNS용액 3 mL에 가하고 진탕 항온수조(95°C, 5분, 150 rpm)에서 반응시킨 후 20분간 냉각하였다. 이후 증류수를 이용하여 25 mL로 정용하고, 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원당 정량은 D-glucose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 표준물질로 사용했으며, 표준 검량선을 작성하여 환원당 함량은 mg glucose/g으로 나타냈다.

옥수수 가루의 페놀산 분획 추출

옥수수 가루 2.0 g을 70% 에탄올(10 mL)에 넣고 25°C에서 3시간 동안 교반(200 rpm)한 후, 원심분리(10,000 \times g, 10분, 4°C)하여 상층액만을 수거하고, 남은 잔사에 다시 70% 에탄올(10 mL)을 넣어 같은 절차를 2회 더 반복하였다. 수거된 상층액을 모아서 진공회전농축기(40°C)로 감압농축하고, 이를 다시 10% 에탄올(10 mL)에 재분산하고 1 M HCl을 가하여 pH 2.0으로 조정하였다. 산성화된 추출물에 에틸아세이트:에틸에테르(1:1, v/v) 혼합액을 가하고, 1시간 동안 강하게 교반 후 에틸아세이트:에틸에테르 분획층만 수거하였으며, 이 과정을 4회 더 반복하였다. 얻어진 에틸아세이트:에틸에테르 분획층은 진공회전농축기로 완전히 농축하고 3 mL의 메탄올에 녹여 실험에 사용하였다.

옥수수 가루의 총 페놀 화합물 함량 분석

시료의 총 페놀 화합물 함량 분석은 Folin-Ciocalteu법(Adom과 Liu, 2002)을 일부 변형하여 사용하였다. 일정 농도로 희석시킨 분획 추출물 0.1 mL과 2% sodium carbonate (Na_2CO_3) 2 mL을 혼합하고 암실에서 3분간 반응시킨 다음, 50% Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) 시약 0.1 mL을 가하고 암실에서 30분간 반응시킨 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid (Sigma-Aldrich)으로 검량선을 작성한 후 총 페놀 화합물 함량은 gallic acid equivalent (mg GAE/100 g)로 나타냈다.

옥수수 가루의 유리 페놀산 조성 분석

시료의 유리 페놀산 조성과 함량은 페놀산 분획 추출물을 0.25 μ m syringe filter로 여과하여 역상 고성능 액체크로마토그래피(reversed-phase high-performance liquid chromatography, Ultimate 3000 system, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA)로 분석하였다. 분석 컬럼은 Capcell-pak C₁₈ column (4.6 \times 250 mm, 5 μ m, Shiseido, Tokyo, Japan), 검출기는 UV 검출기를 사용하였다. 이동상은 A (0.02% trifluoroacetic acid 함유 증류수)와 B (0.02% trifluoroacetic acid 함유 메탄올)를 0.4 mL/min 유속으로 흘려주었으며, 기울기 조건(gradient elution)은 0-30분(0-15% B), 30-45분(15-25% B), 45-60분(25-50% B), 60-65분(50-100% B), 65-67.5분(100% B), 67.5-70분(100-0% B), 70-75분(0% B)으로 설정하였다. 컬럼 온도와 시료 주입량은 각각 40°C와 20 μ L로 설정하였다. 페놀산 종류에 따라 검출 UV 파장을 달리하였으며, hydroxybenzoic acid 계열은 280 nm, hydroxycinnamic acid 계열은 320 nm 파장에서 측정하였다.

Table 1. Characteristics, sources, and optimal conditions of commercial carbohydrases

Enzymes ¹⁾	Major characteristics ²⁾	Sources	Optimum conditions	
			pH	Temp. (°C)
Pentopan 500 BG	Endo 1-4 β -xylanase	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	4.0-6.0	45-55
Ultraflo L	Heat stable multi-active β -glucanase	<i>Humicola insolens</i>	4.5-7.0	40-60

¹⁾Commercial products of Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark).

²⁾Provided by the manufacturers.

옥수수 가루의 항산화활성 측정

옥수수 가루 페놀산 분획 추출물의 항산화활성은 ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethyl-benzo-thiazoline-6-sulfonic acid) 라디칼 소거활성과 FRAP (ferric reducing antioxidant power) 방법을 이용하여 측정하였다. ABTS 라디칼 소거활성은 Re 등(1999)의 방법을 일부 수정하여 7.4 mM ABTS 용액과 2.6 mM potassium persulphate 용액을 1:1의 비율로 혼합하고 암실에서 하루 동안 반응시킨 후, 735 nm에서 흡광도가 1.4가 되도록 메탄올로 조정된 다음 사용하였다. 희석된 ABTS 용액 1 mL과 페놀산 분획 추출액 20 µL를 혼합하여 암소에서 30분 동안 반응시키고 735 nm에서 흡광도를 측정하였다. FRAP는 Benzie와 Strain(1996) 방법을 일부 수정하여 측정하였다. 페놀산 분획 추출물 희석액(30 µL)과 300 mM acetate buffer (pH 3.6): 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine): 20 mM ferric chloride hexahydrate (FeCl₃·6H₂O)을 10:1:1 (v/v/v)의 비율로 혼합한 FRAP 반응용액(1 mL)을 혼합하고 암소에서 4분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. Trolox (Sigma-Aldrich)는 항산화활성 실험에서 주로 사용되는 표준물질로, 모든 항산화활성은 trolox로 검량선을 작성하고 trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC, mmol trolox eq./g)로 표현하였다.

통계분석

모든 실험결과는 3회 반복하였으며, 얻어진 측정값은 SPSS 통계 package program (statistical package social science, version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분산분석 (ANOVA test)을 실시하였고, 다중범위시험법(Duncan's multiple range test)로 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

탄수화물 가수분해효소 처리 옥수수 가루의 환원당 함량

탄수화물 가수분해효소 처리에 따른 탄수화물 분해 정도를 알아보기 위하여 수용화된 환원당 함량을 조사하였다(Table 2). 그 결과, 옥수수 가루의 환원당 함량은 1.05%였으며, Pentopan 500 BG와 Ultraflo L 처리한 옥수수 가루의 환원당 함량은 각각 1.29 및 1.95%로 대조군과 비교하여 유의적으로 높았다. 환원당 함량이 증가한 것은 효소 처리가 잘 이루어졌음을 의미한다. 각각의 탄수화물 가수분해 효소에 의해 고분자의 탄수화물이 저분자화됨에 따라 옥수수 가루의 환원당 함량이 증가하였다. 탄수화물 가수분해효소는 옥수수의 전분, 셀룰로스와 헤미셀룰로스와 같은 고분자 탄수화물을 분해하여 저분자화시키기 때문에 수용성 탄수화물 함량을 증가시킨다.

탄수화물 가수분해효소 처리에 따른 환원당 함량 증가는 다양한 논문에서 보고되어진다. Alrahmany 등(2013)은 귀리 겨(oat bran)에 네 종류의 탄수화물 가수분해효소(viscozyme, α-amylase, celluclast, amyloglucosidase)를 처리하였을 때 모든 효소처리군의 환원당 함량이 대조군보다 유의적으로 높으며, 특히 viscozyme 처리군은 환원당 함량이 대조군에 비해 10.7배 높다고 보고하였다. Kapsakalidis 등(2009)은 블랙커런트(black currant) 부산물에 상업적으로 이용되는 cellulase (C13L, Biocatalysts, Pontypridd, U.K.)를 처리하면 환원당의 비율이 증가한다고 보고하였다. Kim과 Lim(2016)은 Pentopan 500 BG와 Ultraflo L을 포함한 6종의 탄수화물 가수분해효소 처리가 미강(rice bran)의 환원당뿐만 아니라 추출효율 및 총당 함량을 유의적으로 증가시킨다고 하였다. 탄수화물 가수분해효소 처리가 다양한 곡류의 환원당 및 총당 함량에 미치는 영향에 관한 연구는 다양하게 진행되었다. 하지만

Table 2. Reducing sugar and total phenolics content in enzyme treated maize flours

Samples ¹⁾	Reducing sugar (%)	Total phenolics content (mg GAE/100 g)
MF	1.05±0.10 ^{e2)}	38.81±0.67 ^c
P-MF	1.29±0.04 ^b	47.43±1.07 ^b
U-MF	1.95±0.09 ^a	62.42±1.46 ^a

¹⁾MF, maize flour; P-MF, Pentopan 500BG treated MF; U-MF, Ultraflo L treated MF.

²⁾Values (dry weight basis) with different superscripts within column are different with statistical significance ($p < 0.05$).

아직 효소처리에 따른 탄수화물의 구조 변화에 대한 연구는 진행되지 않고 있다. 앞으로 탄수화물 가수분해효소 처리된 곡류를 상업적으로 이용하기 위해서는 효소 처리가 탄수화물, 특히 식이 섬유질의 구조와 구성에 미치는 영향에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

탄수화물 가수분해효소 처리 옥수수 가루의 총 페놀화합물 함량

탄수화물 가수분해효소 처리에 따른 옥수수 가루의 총 페놀화합물 함량은 Table 2에 나타났다. 옥수수 가루의 총 페놀산 함량은 38.81 mg GAE/100 g이었으며, 이는 기존 보고들과 유사하였다. De la Parra 등(2007)은 5품종 옥수수 가루의 유리 페놀산 함량이 34.7-50.0 mg GAE/100 g (dry basis)이라고 하였으며, Lee 등(2010)은 옥수수의 유리 페놀산 함량이 103.5 mg GAE/100 g이라고 하였다. 또한 Lopez-Martinez 등(2009)은 옥수수의 유리 페놀산 함량이 과피 색상에 큰 영향을 받으며, 특히 자색 및 흑색 과피를 가진 옥수수가 유리 페놀산 함량이 높다고 하였다. 페놀화합물의 페놀 고리는 자유라디칼을 안정화시킴으로써 항산화활성을 가진다. 옥수수에서 페놀산을 비롯한 다양한 항산화성분은 주로 과피에 존재하며, 이는 옥수수뿐만 아니라 다양한 곡류에서 공통적이다. 따라서 옥수수 등 다양한 곡류는 도정을 하지 않고 전곡 상태 그대로 섭취하는 것이 건강에 좋다.

탄수화물 가수분해효소는 옥수수 가루의 총 페놀 화합물 함량을 유의적으로 증가시켰다. Pentopan 500 BG와 Ultraflo L 처리는 옥수수 가루의 총 페놀 화합물 함량을 각각 1.2 및 1.6 배 증가시켰다. 효소처리물의 페놀화합물 함량 증가는 탄수화물 가수분해효소가 옥수수 가루의 페놀 화합물을 추출되기 쉬운 형태로 전환시켰기 때문이다. 효소처리는 세포벽을 비롯한 탄수화물 매트릭스를 분해하여, 그 구조를 영성하게 할 것이다. 또한 페놀산은 세포벽의 고분자 탄수화물과 결합하고 있는데, 효소는 이를 저분자화하고 불용성 페놀산을 공액 페놀산으로 변화시킬 것이다. 분자량이 상대적으로 작은 공액 페놀산은 물이나 에탄올과 같은 극성용매에 잘 녹으며 추출되기 쉬워질 것이다. 이는 효소 처리에 따른 환원당 변화(Table 2)와도 일치한다. 또한 효소 활성화를 위한 수분과 온도(40°C) 조건이 총 페놀 화합물 함량을 증가시킬 수 있다. 일부 항산화물질은 열에 약하고 그 구조가 불안정하기 때문에 열처리는 열에 불안정한 항산화물질의 함량을 감소시킬 수 있지만, 열처리는 물질의 추출효율을 높일 수도 있다. Kwak 등(2013)은 적당한 열처리가 수용성 물질의 추출효율을 증가시킬 뿐만 아니라, 추출물의 페놀산 함량과 항산화활성을 증가시킬 수 있다고 하였다.

상업적으로 이용되는 탄수화물 가수분해효소는 미생물에서 얻어지는 것이며, 탄수화물 가수분해효소 처리는 발효(fermentation)와 유사하다고 할 수 있다. 효소 처리와 마찬가지로 발효 미생물

Table 3. Phenolic acid composition of enzyme treated maize flours

Samples ¹⁾	Hydroxycinnamic acid derivatives (mg/100 g)				
	Cinnamic acid	Caffeic acid	<i>p</i> -Coumaric acid	Ferulic acid	Sinapic acid
MF	0.11±0.01 ^{b2)}	0.05±0.00 ^c	1.23±0.09 ^c	1.69±0.04 ^c	0.09±0.01 ^b
P-MF	0.14±0.02 ^a	0.06±0.00 ^b	1.60±0.11 ^b	4.10±0.09 ^b	0.07±0.00 ^b
U-MF	0.12±0.01 ^{ab}	0.10±0.01 ^a	3.11±0.09 ^a	33.90±0.032 ^a	0.48±0.03 ^a

Samples	Hydroxybenzoic acid derivatives (mg/100 g)				Total
	4-Hydroxybenzoic acid	Vanillic acid	Gallic acid	Syringic acid	
MF	0.07±0.01 ^c	0.36±0.01 ^c	0.04±0.00 ^b	0.13±0.00 ^c	3.76
P-MF	0.18±0.01 ^b	0.50±0.00 ^b	0.03±0.00 ^c	0.17±0.00 ^b	6.85
U-MF	0.33±0.00 ^a	1.24±0.01 ^a	0.05±0.01 ^a	0.23±0.00 ^a	39.55

¹⁾MF, maize flour; P-MF, Pentopan 500BG treated MF; U-MF, Ultraflo L treated MF.

²⁾Values (dry weight basis) with different superscripts within column are different with statistical significance ($p < 0.05$).

에 의해 생성되는 탄수화물 가수분해효소는 곡류의 페놀화합물 함량을 증가시킨다. Yadav 등(2013)은 조(finger millet)에 *Rhizopus oryzae*를 처리함으로써 유리 페놀화합물 함량 및 항산화활성을 증가시켰으며, 이는 접종균주의 β -glucosidase 활성과 비례한다고 보고하였다. McCue 등(2003)은 *Rhizopus oligosporus* 접종처리에서도 β -glucosidase 활성과 유리 페놀산 함량이 밀접한 관계를 가진다고 하였다. 따라서 페놀화합물 및 항산화활성 증가에 대한 탄수화물 가수분해효소의 정확한 작용 기작을 규명하게 된다면, 이후에는 경제적인 미생물 발효를 이용하여 옥수수의 페놀산 함량과 항산화활성을 증가시킬 수 있을 것이라 생각된다.

옥수수는 쌀, 밀, 귀리와 비교하여 페놀산 함량이 높은 식량 작물이다. Adom과 Liu(2002)는 비록 옥수수의 유리 페놀산은 쌀이나 밀과 유사하지만 불용성 페놀산 함량은 쌀이나 밀과 비교하여 2.2 및 3.9배 높다고 하였다. 따라서 탄수화물 가수분해효소 처리에 따른 유리 페놀산 함량 증가는 쌀이나 밀보다 불용성 페놀산 함량이 높은 옥수수가 더 효과적일 것이라 생각된다.

탄수화물 가수분해효소 처리 옥수수 가루의 유리 페놀산 함량

세포벽 분해효소 처리에 따른 옥수수 가루의 유리 페놀산 조성 및 함량 변화는 고성능 액체 크로마토그래피로 측정하였으며, 결과는 Table 3에 나타났다. 옥수수 가루에 가장 많이 존재하는 유리 페놀산은 ferulic acid이었으며, 그 다음으로 *p*-coumaric acid, vanillic acid, syringic acid, cinnamic acid, sinapic acid, 4-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, gallic acid 순서였다. Sosulski 등(1982)은 옥수수의 주요한 유리 페놀산은 ferulic acid와 *p*-coumaric acid이며, 이들의 함량은 각각 0.51, 0.62 mg/100 g이라고 하였다. Yu 등(2010)은 옥수수 10품종의 유리 ferulic acid와 *p*-coumaric acid의 함량을 조사한 결과, 각각 0.123-1.532 및 0.287-2.047 mg/100 g의 범위에 있다고 하였다. 옥수수는 쌀, 보리, 밀, 귀리 등의 식량작물과 비교하여 유리 페놀산 함량이 높다(Boz, 2015; Sosulski 등, 1982). 이와 같이 옥수수는 다른 식량 작물보다 항산화활성이 뛰어난 유리 페놀산을 다량 함유하고 있기 때문에 앞으로 이를 활용한 건강기능식품 및 화장품 개발에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

탄수화물 가수분해효소의 처리는 옥수수 가루의 유리 페놀산 함량을 유의적으로 증가시켰다(Table 3). Pentopan 500 BG 처리 옥수수 가루에서 ferulic acid를 포함한 대부분의 유리 페놀산(4-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, syringic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, sinapic acid) 함량은 유의적으로 증가하였지만,

gallic acid와 cinnamic acid는 큰 변화가 없었다. 이와 같은 경향은 Ultraflo L에서도 마찬가지였다. Pentopan 500 BG와 Ultraflo L 처리군의 총 페놀산 함량은 대조군(무처리군)과 비교하여 각각 1.8 및 10.5배 높았다. 또한 각각의 유리 페놀산 중에서 가장 많은 증가율을 보인 페놀산은 ferulic acid이었으며, 이는 두 효소처리에 의해 각각 2.4 및 20.0배 증가하였다.

식물의 세포벽은 cellulose, xyloglucan, arabinoxylan, pectin, β -glucan 등의 다양한 구조 탄수화물(structural carbohydrate)로 이루어져 있다. 또한 세포벽의 단단한 구조를 가지기 위해서는 구조 탄수화물이 가교결합(cross-linking)을 하고 있어야 하며, 이에 주로 이용되는 화합물이 ferulic acid나 *p*-coumaric acid와 같은 페놀산이다. 실험에 사용된 탄수화물 가수분해효소인 Pentopan 500 BG와 Ultraflo L의 주된 효소는 각각 β -xylanase와 β -glucanase이며(Table 1), 각각 세포벽의 헤미셀룰로스의 β -xylan을 xylose로, 셀룰로스의 β -glucan을 glucose로 분해한다.

옥수수에 존재하는 페놀산 대부분은 불용성 형태로 세포벽의 구조 탄수화물과 결합된 형태로 존재한다(Acosta-Estrada 등, 2014; Chiremba 등, 2012; Lopez-Martinez 등, 2009). Sosulski 등(1982)은 전체 페놀산에서 유리 페놀산이 차지하는 비율은 오직 5.3%라고 하였다. Dewanto 등(2002)은 옥수수에서 유리, 공액, 불용성 ferulic acid가 차지하는 비율은 각각 0.2, 2.3 및 97.4%라고 했다. Adom과 Liu(2002)는 쌀, 밀, 귀리와 비교하여 옥수수가 불용성 페놀산 비율이 높다고 하였으며, Dewanto 등(2002)과 유사한 결과를 보고하였다.

탄수화물 가수분해효소 처리에 따른 수용성 페놀산 함량의 급격한 증가는 효소 처리가 불용성 페놀산과 결합하고 있는 세포벽의 구조 탄수화물 매트릭스를 분해함으로써 불용성 페놀산 일부가 수용성으로 전환되기 때문으로 생각된다. 탄수화물 가수분해효소에 의한 불용성 페놀산의 유리화는 다양한 논문에서 보고된다. Moore 등(2006)은 밀기울(wheat bran)에 탄수화물 가수분해효소를 처리하면 효소에 따라 정도의 차이가 있지만 불용성 페놀산 함량이 감소하는 반면, 유리 페놀산 함량이 증가한다고 하였다. 특히 Ultraflo L 처리는 유리 vanillic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid의 함량을 유의적으로 증가시켰다. Kim과 Lim(2016)은 Viscozyme L을 비롯한 6종의 탄수화물 가수분해효소가 현미 미강의 유리 페놀산 함량 증가에 효과적이며, 특히 Ultraflo L은 유리 ferulic acid 함량을 4.1배 증가시켰다고 하였다. Alrahmany 등(2013)은 귀리 겨(oat bran)에서 탄수화물 가수분해효소 종류에 따라 유리 페놀산 증가 양상이 다르다고 하였다.

Table 4. ABTS radical scavenging activities and ferric reducing antioxidant power of the enzyme treated maize flours

Samples ¹⁾	ABTS radical scavenging activity (mmol trolox equivalent/100 g)	Ferric reducing antioxidant power (mmol trolox equivalent/100 g)
MF	12.59±0.52 ^{c2)}	10.17±0.11 ^c
P-MF	16.03±0.12 ^b	12.50±0.21 ^b
U-MF	18.95±0.24 ^a	16.48±0.33 ^a

¹⁾MF: maize flour, P-MF: Pentopan 500BG treated MF, U-MF: Ultraflo L treated MF.

²⁾Values (dry weight basis) with different superscripts within column are different with statistical significance ($p < 0.05$).

Kim 과 Lim(2016)도 미강(rice bran)에서 비슷한 결과를 보고하였으며, 이는 상업적으로 이용되는 효소에는 주된 탄수화물 가수분해 효소 활성 외의 보조적인 효소의 활성이 있기 때문이라고 하였다.

또한 상업적으로 이용되는 탄수화물 가수분해 효소가 가지는 phenolic acid esterase 활성 또한 옥수수 가루의 유리 페놀산 함량 증가에 기인할 것으로 생각된다. 불용성 페놀산 대부분은 세포벽의 구성성분과 에스터 결합(ester bond)을 형성하고 있으며, 이를 끊고 페놀산을 유리 형태로 바꾸기 위해서는 phenolic acid esterase 가 있어야 한다. 즉, phenolic acid esterase 활성이 있어야 효과적으로 유리형 페놀산을 만들 수 있으며, 만약 이에 대한 활성이 없다면 불용성 페놀산 대부분은 완전히 유리되지 못하고 당류가 붙어있는 공액 형태로 세포벽에서 분리될 것이다. 상업적으로 이용되는 탄수화물 가수분해 효소는 미생물에서 정제되어 지는데, 이들 대부분은 feruloyl esterase나 caffeoyl esterase와 같은 phenolic acid esterase 활성을 보조로 가지는 경우가 있다. *Humicola insolens*에서 추출되는 Ultraflo L은 ferulate (ferulic acid), sinapate (sinapic acid), *p*-coumarate (*p*-coumaric acid), caffeate (caffeic acid)와 세포벽 사이의 결합을 끊을 수 있는 esterase 활성을 가지고 있다(Faulds 등, 2002). Di Gioia 등(2007)은 상업적으로 이용되는 탄수화물 가수분해 효소의 특성을 관찰하였으며, pentopan 500 BG를 비롯한 일부 효소에서 feruloyl esterase와 caffeoyl esterase 활성이 있음을 발견하였다. 또한 Xue 등(2017)은 phenolic acid esterase 활성을 가진 탄수화물 가수분해 효소가 유리 페놀산 함량을 증가시키는데 효과적이라고 보고하였다. 대부분의 탄수화물 가수분해 효소는 phenolic acid esterase 활성을 가지고 있으며, 이들은 옥수수 가루의 페놀산 함량을 증진시킬 수 있을 것이라 생각된다.

탄수화물 가수분해 효소 처리 옥수수 가루의 항산화 활성

옥수수 가루의 항산화 활성은 ABTS 라디칼 소거 활성과 FRAP 방법으로 측정하였으며, 그 결과는 Table 4에 나타났다. 효소 처리하지 않은 옥수수 가루의 ABTS 라디칼 소거 활성과 FRAP는 각각 12.59 및 10.17 mmol trolox eq./100 g이었으며, 이는 기존의 보고와 유사하였다. Zilic 등(2012)은 품종에 따라 차이가 있지만 옥수수 종실의 ABTS 라디칼 소거 활성이 약 15-35 mmol trolox eq./kg이며, 옥수수의 항산화 활성은 페놀산, 플라보노이드, 안토시아닌, 카로테노이드 등과 같은 페놀 화합물 함량과 상관관계에 있다고 하였다. Salar 등(2012)도 ABTS 라디칼 소거 활성으로 측정된 옥수수의 항산화 활성이 약 15 mmol trolox eq./kg이라고 하였다. 또한 Ku 등(2014)은 40품종의 옥수수 대부분에서 ABTS 라디칼 소거 활성이 FRAP보다 높게 측정된다고 하였다. Pentopan 500 BG와 Ultraflo L 처리군의 ABTS 라디칼 소거 활성은 각각 16.03 및 18.95 mmol trolox eq./100 g으로 대조군(12.59 mmol trolox eq./100 g)과 비교하여 각각 1.3 및 1.5배 높았다. FRAP 실험법에서도 ABTS 라디칼 소거 활성과 유사한 경향을 보여, Pentopan 500 BG와 Ultraflo L 처리군의 FRAP는 각각 12.50 및

16.48 mmol trolox eq./100 g으로 대조군(10.17 mmol trolox eq./100 g)과 보다 각각 1.2 및 1.6배 높았다.

이와 같은 옥수수 가루의 항산화 활성 증가는 효소 처리에 의한 유리 페놀 화합물 및 페놀산의 함량 증가에 기인한다(Table 2 및 3). 페놀산을 포함한 다양한 페놀 화합물은 항산화, 항염증, 심혈관계 질환 예방 등 다양한 효과를 가지고 있으며, 옥수수를 비롯한 다양한 식물체에서는 곤충 및 미생물에 대한 방어 기작 등에서 중요한 역할을 한다(Balasundram 등, 2006). Kim과 Lim(2016)은 탄수화물 가수분해 효소 처리가 미강의 항산화 활성을 2배 이상 증가시킨다고 하였다. 또한 Moore 등(2006)은 탄수화물 가수분해 효소 처리가 밀기울의 항산화 활성도 유의적으로 증가시키며, 항산화 활성 증가 정도는 효소 처리량에 비례한다고 하였다. Salar 등(2012)은 옥수수의 미생물 발효가 α -amylase, β -glucosidase, xylanase 등의 효소 활성화와 함께 페놀 화합물 함량과 항산화 활성을 증가시키며, 이 때 페놀 화합물 함량과 항산화 활성은 정의 상관관계를 가진다고 하였다.

본 연구에서 옥수수 가루의 항산화 활성은 효소 처리에 의해 증가하였지만, 유리 페놀산 및 페놀 화합물 함량과 정의 상관관계를 가지지 않았다(Table 2 및 3 vs 4). 이는 옥수수 가루에 페놀산 및 페놀 화합물 외의 다른 항산화 성분이 존재하기 때문으로 생각된다. 옥수수에는 카로테노이드, 탄닌, 플라보노이드, 안토시아닌과 같은 다양한 페놀 계열의 화합물뿐만 아니라 비타민, 기능성 지방산 등 다양한 항산화 물질을 가지고 있다(Bacchetti 등, 2013). 그럼에도 불구하고 효소 처리는 페놀산 및 총 페놀 화합물 함량뿐만 아니라 옥수수 가루의 항산화 활성을 증진시키는데 효과적인 것을 본 실험을 통해 관찰할 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 탄수화물 가수분해 효소가 옥수수 가루의 페놀 화합물 및 항산화성에 미치는 영향을 조사하였다. 옥수수 가루는 빵, 과자 등 다양한 가공 식품 뿐만 아니라 가축용 사료로도 이용되고 있으며, 이에 대한 기능성의 증가는 국민 및 반려동물의 건강성 증진에 기여할 수 있을 것이다. 본 실험에서 탄수화물 가수분해 효소 처리는 옥수수 가루의 유리 페놀산 및 총 페놀 화합물 함량을 유의적으로 증가시켰으며, 이는 효소 처리가 세포벽 구성성분과 강하게 결합하고 있는 불용성 페놀산을 유리화하기 때문이다. 또한 옥수수 가루의 항산화 활성 또한 효소 처리에 의해 유의적으로 증가하였는데, 이는 강한 항산화 활성을 가진 유리 페놀산이 탄수화물 가수분해 효소에 의해 증가하였기 때문이다. 상용 탄수화물 가수분해 효소 처리는 친환경적일 뿐만 아니라 공정이 단순하여 상업적으로 이용하기 쉬운 것이라 생각된다. 하지만 아직 탄수화물 가수분해 효소 처리가 옥수수 가루의 가공 적성에 미치는 영향 및 생산법 최적화에 대한 연구가 이루어져 있지 않으며 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 AGENDA 연구사업(과제번호: PJ01117201)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Acosta-Estrada BA, Gutierrez-Urbe JA, Serna-Saldvar SO. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chem.* 152: 46-55 (2014)
- Adom KK, Liu RH. Antioxidant activity of grains. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6182-6187 (2002)
- Alrahmany R, Avis TJ, Tsopmo A. Treatment of oat bran with carbohydrases increases soluble phenolic acid content and influences antioxidant and antimicrobial activities. *Food Res. Int.* 52: 568-574 (2013)
- Bacchetti T, Masciangelo S, Micheletti A, Ferretti G. Carotenoids, phenolic compounds and antioxidant capacity of five local Italian corn (*Zea mays* L.) kernels. *J. Nutr. Food Sci.* 3: 1-4 (2013)
- Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99: 191-203 (2006)
- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239: 70-76 (1996)
- Boz H. Ferulic acid in cereals-a Review. *Czech J. Food Sci.* 33: 1-7 (2015)
- Chandrasekara A, Shahidi F. Bioactivities and antiradical properties of millet grains and hulls. *J. Agric. Food Chem.* 59: 9563-9571 (2011)
- Chiremba C, Taylor JR, Rooney LW, Beta T. Phenolic acid content of sorghum and maize cultivars varying in hardness. *Food Chem.* 134: 81-88 (2012)
- De la Parra C, Serna Saldivar SO, Liu RH. Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips. *J. Agric. Food Chem.* 55: 4177-4183 (2007)
- Dewanto V, Wu X, Liu RH. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4959-4964 (2002)
- Di Gioia D, Sciubba L, Setti L, Luziatelli F, Ruzzi M, Zanichelli D, Fava F. Production of biovanillin from wheat bran. *Enzyme Microb. Technol.* 41: 498-505 (2007)
- Faulds C, Sancho A, Bartolom B. Mono-and dimeric ferulic acid release from brewer's spent grain by fungal feruloyl esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 489-494 (2002)
- Hanmoungjai P, Pyle DL, Niranjana K. Enzyme-assisted water-extraction of oil and protein from rice bran. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77: 771-776 (2002)
- Hourigan JA, Chesterman CF. Application of carbohydrases in extracting protein from rice bran. *J. Sci. Food Agric.* 74: 141-146 (1997)
- Kapasakalidis PG, Rastall RA, Gordon MH. Effect of a cellulase treatment on extraction of antioxidant phenols from black currant (*Ribes nigrum* L.) pomace. *J. Agric. Food Chem.* 57: 4342-4351 (2009)
- Kim SM, Lim ST. Enhanced antioxidant activity of rice bran extract by carbohydrase treatment. *J. Cereal Sci.* 68: 116-121 (2016)
- Ku KM, Kim HS, Kim SK, Kang YH. Correlation analysis between antioxidant activity and phytochemicals in Korean colored corns using principal component analysis. *J. Agric. Sci.* 6: 1-9 (2014)
- Kwak J, Oh SK, Kim DJ, Lee JH, Yoon MR, Kim HW, Lee JS. Effects of heat-treated brown rice on total phenolics and antioxidant activities. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 534-541 (2013)
- Lee DJ, Choi SM, Lim ST. Effect of hydrothermal and enzymatic treatments on the physicochemical properties of waxy maize flour. *Korean J. Food Sci. Technol.* 48: 165-171 (2016)
- Lee SH, Hwang IG, Kim HY, Lee HK, Lee SH, Woo SH, Lee J, Jeong HS. Physicochemical property and antioxidant activity of *Daehak* waxy corns with different harvest times. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 719-724 (2010)
- Lopez-Martinez LX, Oliart-Ros RM, Valerio-Alfaro G, Lee CH, Parkin KL, Garcia HS. Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT-Food Sci. Technol.* 42: 1187-1192 (2009)
- McCue P, Shetty K. Role of carbohydrate-cleaving enzymes in phenolic antioxidant mobilization from whole soybean fermented with *Rhizopus oligosporus*. *Food Biotechnol.* 17: 27-37 (2003)
- Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428 (1959)
- Moore J, Cheng Z, Su L, Yu L. Effects of solid-state enzymatic treatments on the antioxidant properties of wheat bran. *J. Agric. Food Chem.* 54: 9032-9045 (2006)
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237 (1999)
- Salar RK, Certik M, Brezova V. Modulation of phenolic content and antioxidant activity of maize by solid state fermentation with *Thamnidium elegans* CCF 1456. *Biotechnol. Biopro. Eng.* 17: 109-116 (2012)
- Sosulski F, Krygier K, Hogge L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *J. Agric. Food Chem.* 30: 337-340 (1982)
- Xue Y, Wang X, Chen X, Hu J, Gao MT, Li J. Effects of different cellulases on the release of phenolic acids from rice straw during saccharification. *Bioresour. Technol.* 234: 208-216 (2017)
- Yadav MP, Moreau RA, Hicks KB. Phenolic acids, lipids, and proteins associated with purified corn fiber arabinoxylans. *J. Agric. Food Chem.* 55: 943-947 (2007)
- Yadav G, Singh A, Bhattacharya P, Yuvraj J, Banerjee R. Comparative analysis of solid-state bioprocessing and enzymatic treatment of finger millet for mobilization of bound phenolics. *Biopro. Biosyst. Eng.* 36: 1563-1569 (2013)
- Yu MH, Kim EO, Choi SW. Quantitative changes of hydroxycinnamic acid derivatives and anthocyanin in corn (*Zea mays* L.) according to cultivars and heat processes. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 843-852 (2010)
- Zilic S, Serpen A, Ak 1 Il 1 oglu G, Gokmen V, Vancetovic J. Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays* L.) kernels. *J. Agric. Food Chem.* 60: 1224-1231 (2012)