

韓國產 도토리 利用에 關한 研究

第 1 報 : Tannin 分解酵素 生産菌株의 檢索, 韓國在來式 方法에
依하여 Tannin 을 除去한 도토리 粉末의 一般成分 및
同蛋白質의 Amino acid 組成에 關하여

金 昌 湜·辛 應 泰
(東國大學校工大 食品工學科)

Studies on the Utilization of several varieties of Acorn in Korea

Part 1. Amino Acid Contents of Korean Acorn eliminated Tannin and
Isolation of Strains producing tannin-hydrolyzing-enzyme

by

Chang-Sik Kim and Eung-Tae Shin

Department of Food Technology, College of Engineering, Dong-guk University,
Seoul, Korea.

(Received December 10, 1974)

Abstract

Studies on the elimination of tannin from the acorns containing tannin up to 9%, for the utilization of the acorns in Korea, carried out as follows:

1. The strain of *Asp. niger* sp. which yield the reasonable enzymatic activity of tannase was isolated from the rotten acorns.
2. The method of hydrolyzing tannin in the water by suspending, and agitating the acorn powder: followed by decantation, showed the best result among the conventional methods in the efficiency of removal of tannin and in the economy of the process by reducing the tannin content to 0.18% in 24 hours.
3. It was notable that the acorn powder from which the tannin was eliminated contains various essential amino acids in relatively ample amount.

序 論

도토리는 우리나라 뿐만 아니라 地球上의 다른 몇몇 民族들도 오래前부터 이를 食用으로 消費해 오고 있다. 도토리는 食用에 앞서 收斂性인 tannin (tannic acid)의 除去가 先行되어야 한다. tannin 은 도토리 뿐만 아니라 各種植物에 널리 分布해 있는 成分이며 加水分解에 依하여 多價 phenolic acid 와 혼히는 D-glucose 를 生成하는 配糖體라고

도 볼 수 있는 物質의 總稱으로서 一定한 化合物은 아니다. 沒食子나 五倍子에서 얻은 것은 加水分解에 依하여 沒食子酸과 少量의 glucose 를 生成한다. 이 tannin 은 거의 無色·無定形의 物質로서 물에 녹기 쉽고 水溶液은 酸性 鐵(III)鹽에 依해 黑色 沈澱을 生成한다. 또 tannin 은 蛋白質, gelatin 을 물에 不溶性인 物質로 變化시킨다¹⁾. tannase 는 tannin 을 水解하는 ester 加水分解酵素의 一種인데 tannin 의 所謂 depside 結合을 特異적으로 水解하는 點에서 다른 esterase 類와는 相異한 것이라

고 생각되고 있다²⁾. 近來 많은 種類의 酵素가 結晶化되고 各種酵素의 諸性質도 광범한 酵素化學의 研究에 의하여 續續 밝혀지고 있다. tannase의 發見은 1786年 scheele에 의하여 沒食子로부터 이루어졌으므로 이는 상당히 오래전부터 알려진 酵素이지만 이에 關한 알찬 研究는 적고 아직 不明한 點이 많다. 따라서 tannase의 利用分野도 거의 未開拓狀態라고 할 수 있을 것이다. tannase의 研究에 關해서는 喜多氏³⁾의 麴菌과 tannin 分解, Tóth等⁴⁾의 alumina를 쓴 chromatography에 의한 tannase의 精製, 小田等⁵⁾의 強力한 tannase를 生成하는 絲狀菌의 檢索 및 이의 代用醬油釀造에의 應用, 中林⁶⁾의 *Spirogyra arcta*의 tannin 研究에서 *Asp. niger*로부터의 tannase 調製 및 利用, 果實 및 菜類의 tannin 成分에 關한 研究 Haworth等⁷⁾과 Haslam等⁸⁾의 *Asp. niger* 菌體 抽出液의 ion 交換樹脂 chromatography에 의한 tannase와 glucosidase의 分離精製, 西羅等⁹⁾의 絲狀菌의 tannin 分解酵素에 關한 研究에서 酵素力의 測定法 및 比較, 該酵素의 適應의 生産과 分解產物의 確認 등의 報告가 있다. 最近 Ofcarcik 및 Burns¹⁰⁾들은 미국 산 도토리 的 物理的 化學的 成分組成을 發表하였고 우리나라에서는 劉等¹¹⁾이 tannin 分解酵素 生産菌株의 分離에 도토리 粉末을 添加한 培地를 使用한 研究가 있을 程度이다. 著者들은 '73, '74 兩년에 걸쳐 서울 近郊 水落山에서 12種의 도토리를 採集하여 그중 2種의 成分을 分析하고 tannin 分解酵素 生成菌株를 檢索하였으나 실제 도토리의 tannin 除去에는 보다 經濟的인 方法으로서 鹽水浸漬法 및 水浸漬法等을 試圖하였으며 다시 tannin을 除去한 도토리 粉末의 一般成分 및 同蛋白質의 Amino acid의 組成을 分析하였기에 그 結果를 이에 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

본 實驗用 도토리는 서울 近郊 水落山에서 採集한 것을 風乾시켜 剝皮 粉碎한 것을 試料로 使用하였다. tannin (tannic acid)은 日本藥局方의 것을 使用하였다.

2. 成分分析

가) 一般成分分析

試料 12種中 *Quercus serrata thunb*(줄 참나무)과 *Quercus acutissima carruthers*(상수리나무)의

2種(Fig. 1)에 對하여 水分, 粗脂肪, 粗纖維, 粗蛋白質, 灰分, 可溶性無窒素物 등의 一般成分은 常法에 準하여 각각 定量하였다.

Fig. 1. Two Varieties of Acorn grown in Korea



Quercus acutissima carruthers
(1. 상수리나무)



Quercus serrata thunb.
(10. 줄 참나무)

나) Tannin의 定量

AOAC法¹²⁾에 의하여 定量하였다. 즉 500ml 容후라스크에 試料 5g과 蒸溜水 400ml를 加하여 30分間 沸騰 抽出하고 濾過하여 濾液中の 被酸化物을 酸化시키는데 要하는 potassium permanaganate의 量을 定한 다음 tannin에 gelatin을 作用시켜 남아있는 被酸化物의 量을 求하여 前後의 差로부터 tannin을 算出하였다.

다) 無機鹽類의 分析

試料中 重要無機成分인 Ca, P, Fe를 定量하였다. Ca은 酸化 滴定法¹³⁾에 의하여, P는 Vanado molybdate method¹⁴⁾에 의하여, Fe는 Ortho-phenanthroline method¹⁵⁾에 의하여 각각 定量하였다.

3. 菌株의 分離

菌分離用 培地로서는 絲狀菌의 tannase가 tannin

을 함유하는 培地에서만 適應的으로 生産된다는 事實^{9,16,17}에서 1%의 tannic acid를 添加한 麥芽汁(糖度 Bé 10°, pH 6으로 調節)을 使用하였으며 도토리 腐敗物, 장독 및 장마철의 壁 등으로 부터 mold의 spore를 採取하고 plate culture를 거듭하여 分離 供試하였다.

4. 分離 菌株을 利用한 tannin 分解 酵素力의 測定

가. 酵素液의 調製

西羅⁹의 方法에 따라 3日間 培養한 tannin 添加 밀기울麴의 1% 食鹽水에 依한 抽出液을 만들어 酵素液으로서 使用하였다.

tannin 添加 밀기울 培地의 組成은 다음과 같다.

Composition of medium: wheat bran 5g
tannin 0.1g
tap water 5ml

나. 酵素作用力의 測定

Table 1의 反應混合液을 써서 作用溫度 40°C에서 反應을 일으켜 Rhind-Smith法¹⁸에 따라 酵素力을 測定하였다.

Table 1. Reaction Mixture Solution

0.6%	Tannin solution	50 ml
N/10	Phosphate buffer (pH : 5.8)	20 ml
	Distilled water	20 ml
	Enzyme solution	10 ml
	Toluol	1 ml

Table 2. Chemical Composition of 2 Varieties of Acorn Powder

Composition Species	Moisture	Crude fat	Crude fiber	Crude protein	Crude ash	Tannin	N-free Extract	Ca (mg%)	P (mg%)	Fe (mg%)
<i>Quercus acutissima carruthers</i> (상수리나무)	8.39	3.30	3.02	7.34	2.11	8.24	75.84	115.26	80.15	4.8
<i>Quercus serrata thunb</i> (홀참나무)	6.50	2.08	3.25	7.30	3.38	9.32	77.49	110.78	84.8	5.1

이것을 劉¹¹ 및 ofcarcik¹⁹의 結果와 比較할때 地域 및 品種에 따라, 또 乾燥狀態에 따라 多少의 差는 있는 것 같으나 8~9%의 tannin만 除去한 다면 粗脂肪 2.8~3.30%, 粗蛋白 7.30~7.34%, 粗纖維 3.02~3.25% 粗灰分 2.11~3.38%, 可溶性無窒素物 75~77%로서 食品으로서의 그의 價値는 充分히 認定되는 바이다.

2. Tannin 分解 酵素 生産 菌株의 選別.

5. 韓國在來式 方法에 依한 도토리 tannin의 除去

農家에 傳來되어온 方法中 다음 方法들을 試圖하였다.

가. 鹽水法 (Brine soaking method)

500ml容의 flask에 도토리 粉末 5g씩을 넣고 蒸溜水, 濃度를 달리하는 鹽水로서 각각 채운 다음 60°C의 恆溫기에 넣고 每 20分마다 한번씩 flask를 振蕩한다. 每時間마다 一定量의 沈澱된 도토리(粉末)를 採取하여 3回 水洗하고 乾燥시켜 未溶解殘 tannin의 量을 定量하였다.

나. 水洗法 (Washing method)

割碎한 도토리를 시루에 채우고 이에 繼續 水道 물을 注入하여 tannin을 溶出시켰다.

다. 水洗, 沈澱法 (Washing & settling method)

5l容의 beaker에 도토리 粉末 100~150g을 넣고 水道물을 채운 다음 攪拌後 沈澱시켜 上澄液을 버리는 것을 每時間마다 한번씩 反復하였다.

6. Tannin을 除去한 도토리 粉末의 化學組成.

水洗沈澱 方法으로 tannin이 除去된 것을 다시 乾燥粉末化하여 一般組成을 分析하고 同蛋白質의 amino acid 組成은 gas chromatography로 分析하였다.

結果 및 考察

1. 도토리의 化學組成

2種의 도토리에 對한 化學分析 結果는 table 2와 같았다.

分離한 40餘種의 絲狀菌中 tannin 含有 밀기울 培地에서 菌株의 發育狀態와 分生芽胞子의 着生狀態가 比較的 좋고 tannin 分解 酵素力이 있다고 認定되는 것을 table 3과 같이 5種을 選別하였다.

酵素의 活性은 Fig. 2.와 같았다.

table. 3.에서 보는 바와 같이 tannase의 生産과 菌株의 發育狀態와는 반드시 平衡關係가 있는 것

Table 3. Description of Growth and Enzyme Production on the Tannin containing Wheat Bran Medium

Organism	Character of growth	Activity
A. <i>Aspergillus niger</i> S. P. No. P	good	excellent
B. <i>Aspergillus niger</i> S. P. No. O	good	excellent
C. <i>Aspergillus oryzae</i> No. G	good	good
D. <i>Aspergillus oryzae</i> No. E	excellent	good
E. <i>Penicillium</i> S. P. No. I	excellent	trace

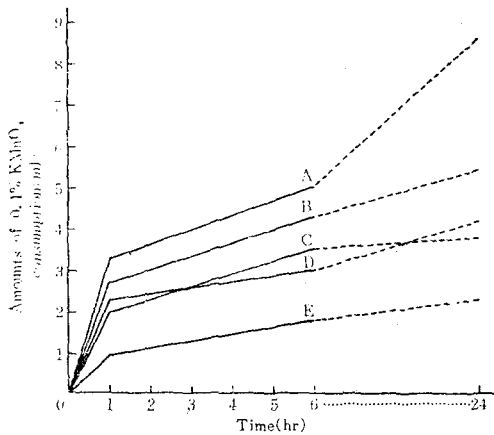


Fig 2 Enzyme Activity of the various Molds
은 아니다. 따라서 菌株의 發育狀態만에 依한 菌株의 分離選擇은 tannase 生産菌에 關한 限別로 意味가 없는 것으로 생각된다.

3. 在來式 方法에 依한 도토리 tannin의 除去가. 鹽水沈澱法 (Brine soaking method)은 20% 및 30%의 鹽水가 가장 效果의으로 나타났으나 (Fig. 3), 60°C의 高溫이 必要하고 鹽水의 調製 및 tannin 除去後 다시 鹽分을 除去해야 하는 등의

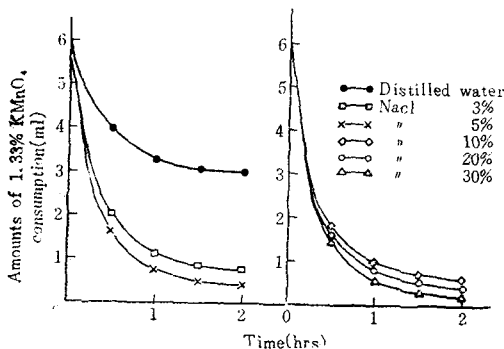


Fig 3. Brine soaking Method (at 60°C)

煩雜함을 면치 못하였다.

나. 水洗法 (Washing method)

水洗法은 Fig. 4.에서 보는 바와 같이 長時間에 서도 別效果가 없는 것 같았다.

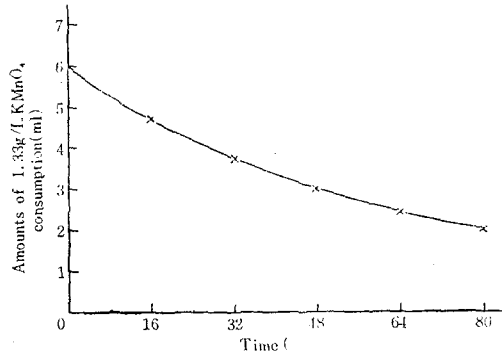


Fig. 4. Washing method (at 24~26°C)

다. 水洗, 沈澱法 (Washing & settling method)

이 方法은 Fig. 4. 및 Fig. 5.에서 보는 바와 같이 24時間 以內에 도토리 粉末의 tannin 含量은 0.2%以下로 떨어졌다. 또 이 方法은 根塊類로부터 澱粉을 製造할때 澱粉의 精製法으로도 써오는 方法으로서 우리나라 農家에 傳來되어온 도토리 脫澱法으로서 가장 效果의이며 經濟的인 方法으로 보인다. 한편 도토리 tannin은 tannin 中에서도 물에 溶解하는 性質이 좋은 것으로 생각된다.

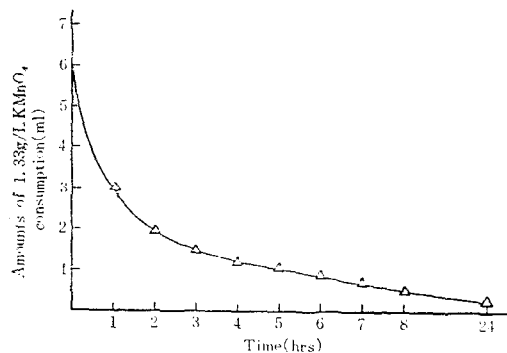


Fig 5. Washing and settling Method
(Temp. of waching water 25°C)

4. Tannin을 除去한 도토리 粉末의 化學成分 및 이의 amino acid 組成

水洗, 沈澱法으로 24時間 脫澱한 도토리 粉末은 다시 水分 14.74%까지 乾燥시킨 後 一般成分 및

Table 4. Chemical Composition of Acorn Powder from which Tannin was eliminated

Acorn Species	Moisture	Crude Ash	Crude Fiber	Crude Protein	Crude Fat	N-free Extract	Tannin	Ca (mg%)	P (mg%)	Fe (mg%)
<i>Quercus serrata</i> thunb. (졸참나무)	14.74	0.73	2.16	7.2	3.58	71.59	0.18	91.5	72.8	4.0

tannin, 無機鹽類等을 分析하였더니 (table 4) table 2와 比較할 때 水分含量差는 있었으나 tannin은 0.18%로 떨어졌고 Ca을 비롯한 灰分 其他 成分도 若干 溶出 減小된 것 같았다.

同도토리 粉末 蛋白質의 amino acid 組成을 G. C.로 측정한 gas-chromatogram¹⁹⁾은 table 5.의 條件에서 Fig. 6.과 같다. 여기서 tryptophan은 試料의 加水分解時 破壞되었고

Table 5. Operating Conditions for Gas Chromatography

Instrument: Varian Aerograph Model 204
6' x 1/4" glass 0.325% Ethylene glycol adipate on chromosorb G (80/100)
Column temp. : 75°-225°C at 4°C/min
Injector temp. : 210°C
Detector temp. : 250°C
Carrier gas: N ₂ at 40ml/min
H ₂ at 40ml/min

histidine, arginine, cystine은 column 條件에 依하여 측정되지 못하였다.

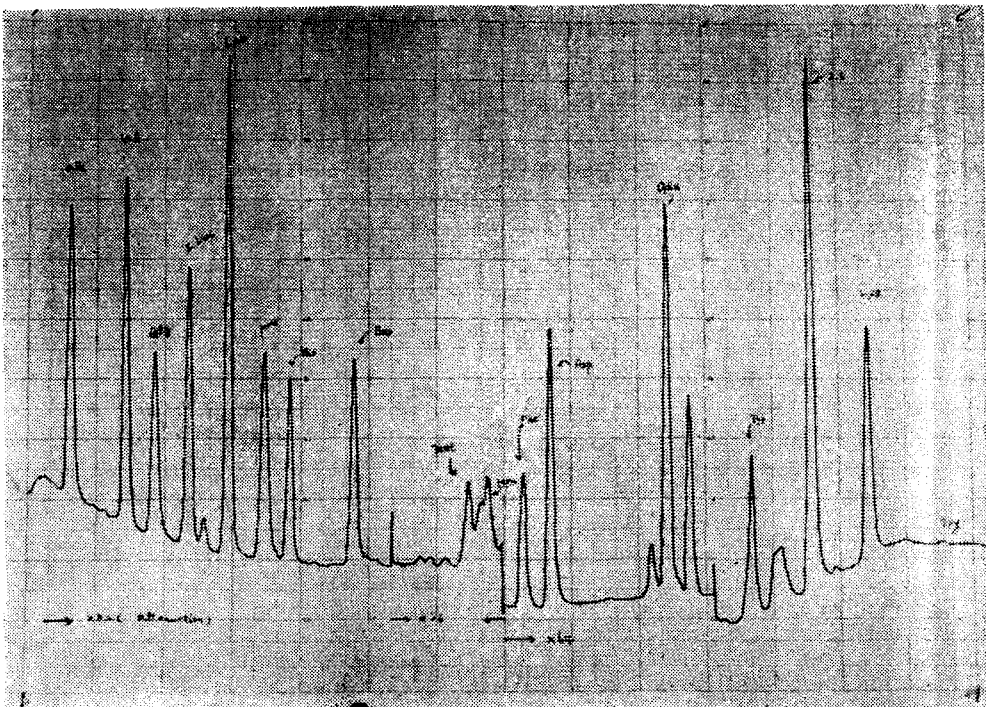
Table 6. Amino Acid Composition of Acorn Powder from which Tannin was eliminated

Amino acids	wt%	Amino acids	wt%
Alanine	0.32	Methionine ^e	0.35
Valine ^e	0.38	Hydroxy proline	0.06
Glycine	0.23	Phenyl alanine ^e	0.95
Isoleucine ^e	0.30	Asparagine	0.52
Leucine ^e	0.58	Glutamine	1.53
Proline	0.31	Tyrosine	0.57
Threonine ^e	0.35	Lysine ^e	0.32
Serine	0.45	Cysteine	Trace

※ e : Essential amino acid

이것을 다시 amino acid 別 重量 %로 고치면 table 6.와 같다. 즉 單一植物性食品으로는 도토리 粉末에 比較的 많은 種類의 필수 아미노산이 豊富하게 들어 있는 것 같다.

Fig 6. Gas-chromatogram for the Amino acids in Acorn from which Tannin was eliminated.



要 約

韓國産 도토리 的 利用을 위하여 도토리 속에 含有되어 있는 8~9%의 tannin 을 除去하는 方法으로서

1. 強力 tannase 生成菌株로서 *Aspergillus niger* sp. 를 腐敗한 도토리로부터 分離하였고

2. 韓國農家에 古來로 傳授되어온 方法中에서 도토리 粉末을 水洗, 攪拌, 靜置해서 上澄液을 버리는 tannin 溶解法이 24 時間內에 tannin 含量을 0.18%까지 줄일 수 있어서 가장 經濟的이고 效果가 크다는 것을 알았다. tannin 을 제거한 도토리 粉末의 成分中 蛋白質의 amino acid 組成은 單一食品으로서는 比較的 많은 種類의 필수아미노산이 함유된 것을 알았다.

本實驗은 74年度 文敎部 研究助成金으로 이루어진 것이다.

참 고 문 헌

- 1) 井上 敏外 3人編：理化學辭典，(岩波書店，日本東京)，830(1955)
- 2) Foster J. W. : Chemical Activity of Fungi, Academic Press Inc., 551(1949)
Prescott S. C. and Dunn C. G. : Industrial Microbiology, McGraw-Hill BookCo, 638(1959)
- 3) 喜多源逸：日本工業化學誌，20, 134(1917)
- 4) Tóth G. and Barsony G. : Enzymol., 11, 19 (1943)
- 5) 小田雅夫, 池田恭一, 谷本正尙：日本醱酵工學誌，27, 16(1949)
- 6) 中林敏郎：日本農化會誌，29, 161(1955)
- 7) Haworth R. D., Jones K. and Rogers H. J. : Chemical Abstract, 52, 8776h(1958)
- 8) Haslam E., Haworth R. D., Jones K. and Rogers H. J. : J. Chem. Soc., 1829(1961)
- 9) 西羅寶, 麥林梅太郎：日本 兵庫農大研究報告, 1(農化篇)：6, (1953)
西羅寶, 麥林梅太郎：日本 兵庫農大研究報告, 2(農化篇)：1, (1955)
- 10) Ofcarcik R. P. and Burns E. E. : J. of Food Science, 36, 576(1971)
- 11) 蔡洙圭·劉太鍾：韓國食品科學會誌，5, 254 (1973)
- 12) Horwitz W. : Official methods of analysis of the AOAC, 11th Edition, 240(1970)
- 13) Fisher, R. B., Peters D. G. : Quantitative Chemical Analysis, Sounders, 561(1968)
- 14) Snell, F. D., Snell, C. T. : Colorimetric Methods of Analysis, Van nostrand, 3rd Edition, 3(1963)
- 15) Horwitz W. : Official methods of analysis of the AOAC, 11th Edition, 164, 212(1970)
- 16) 麥林, 西羅, 西赫, 新家：日本醱酵協會誌 23, 50(1965)
- 17) Rippel A., Keselnig J. : Arch. Mikrobiol., 1, 60(1930)
- 18) Rhind D., Smith F. E. : Biochem. J., 16, 1 (1922)
- 19) Gehrke G. W. : Quantitative gas-liquid chromatography of amino acids in proteins and biological substances, 108(1968)