

머루주 제조방법 개선과 건강기능성

고 경 희

가톨릭대학교 식품영양학 전공

서 론

최근에는 산소 반응물질에 의한 생체의 산화적 장애를 억제하려는 의도로 SOD (superoxide dismutase) 유사활성을 지닌 천연물 소재 개발의 연구가 상당하게 이루어지고 있다. 지금까지는 주로 과채류 내의 β -carotene과 vitamin C에 대해서 연구가 이루어져 왔지만, 최근 각종 과채류에 다량으로 존재하는 천연물질인 플라보노이드류 (flavonoids)에 관심이 모아지고 있다. 플라보노이드류는 폴리페놀 화합물로서 안토시아닌류(anthocyanins), 플라보놀류 (flavonols), 플라본류 (flavones), 카테킨 (catechins) 및 플라바논류(flavanones) 등으로 구성되어 있다. 이들은 과일, 채소, 견과, 씨, 꽃등에 존재하고 인간은 식사를 통해 섭취하게 된다. 특히 산소는 인간의 생존에 결정적인 작용을 하는 것으로 공기 중에서는 안정한 삼중항 산소 (3O_2)로 존재하는데, 호흡을 통해 체내로 들어온 산소는 ATP형태에서 에너지를 생산해 내는 전자전달체계에 서 궁극적인 전자 수용체이다. 그러나 이 과정을 거치면서 어떤 경우에는 전자 흐름이 짝을 짓지 않게 되고 자유 라디칼의 형성을 유도한다. 즉, 과산화 음이온 라디칼 (superoxide anion radical, $O_2^{\cdot-}$), 수산라디칼(hydroxyl radical, $\cdot OH$), 과산화수소 (hydrogen peroxides, H_2O_2), 일중항 산소 (singlet oxygen, 1O_2) 등과 같은 반응성이 매우 큰 산소반응물질 (reactive oxygen species, ROS)들을 형성하게 된다 (Fig. 1).

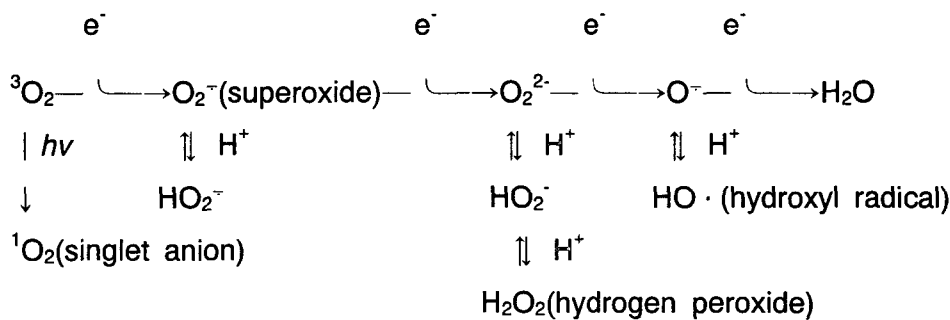


Fig. 1. Scheme to show the formation of reactive oxygen species from the stable triplet oxygen (3O_2).

이들은 건강한 조직에서는 백혈구 등이 이를 이용하여 외부에서 침입한 각종 물질들을 비특이적으로 제거하는 필수적인 물질이기도 하지만 주로 불포화 지방산이 풍부한 생체 막에서 자유라디칼 반응에 관여함으로써 지질 과산화를 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한 지질 외에 단백질, 아미노산, 효소, DNA 등과도 반응하여 기질 자체에 유해한 영향을 끼칠 뿐 아니라 그로 인해 세포 기능을 손상시키고 염증, 암, 동맥경화증, 노화 등의 만성적인 퇴행성 질환의 원인이 된다. 이런 차원에서 서구에서는 포도, 엘더베리 등을 우수한 과실로 세계화 노력에 힘쓰고 있는 반면, 동양권에서만 재배되는 머루의 건강 기능성에 관한 연구가 미비한 상태이다. 우리 나라에서는 고려시대의 여러 산문집 중 <청산별곡> “살어리 살어리랏다 청산에 살어리랏다. 멀위랑 다래랑 먹고 청산에 살어리랏다”에서 알 수 있듯이 고려인들은 산야에 자생하는 머루와 다래를 식용으로 하였음을 알 수 있다. 머루의 열매는 과실로 생식하거나 머루주 및 주스로 식용하고 있으며 약용으로는 과실, 머루줄기 및 덩굴, 뿌리를 이용한 암, 자궁암, 폐결핵, 생선중독, 복막염, 방광염, 기침해소, 피로회복 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

따라서 우리 나라 고유의 개량품종인 머루, 머루주 등이 체내에서 항산화 기전을 가질 것으로 예상되어 경기도 파주시 적성면 감악산 일대에서 노지 재배하는 머루를 1999년 9월중순경 최적기 당함량이 12% 이상일 때 수확하여 머루의 페놀성분 함량을 높이기 위한 발효 제조기술로 만든 머루주 개발과 건강 기능성 성분을 연구로 머루주의 총페놀함량과, HPLC로 머루주 페놀물질 분석, 과산화 음이온 라디칼 소거 능력을 Electron spin resonance spectrometer로 측정하였다.

재 료 및 방 법

총 페놀 함량 측정

Folin-Dennis법을 사용하여 시료의 총페놀 함량을 측정한다. 10배 희석한 시료 1ml에 증류수 60 ml를 가하고, Folin-Ciocalteu's reagent 5 ml를 첨가해 30초간 반응시킨다. 15 ml의 포화 탄산나트륨 용액을 혼합하여 실온에서 2시간 방치한 뒤, 765 nm에서 흡광도 (Spectronic 21, USA)를 측정한다. 측정된 흡광도는 gallic acid를 이용하여 작성한 검량곡선으로부터 mg/L GAE로 환산한다.

과산화 음이온 라디칼 소거작용의 측정

Sato (1997)등과 Mitsuta (1990)등의 방법을 수정, 보완하여 hypoxanthin-xanthin oxidase (HPX-XOD) 체계에서 인위적으로 발생하는 과산화 음이온 라디칼을 electron spin resonance (ESR) spectrometer (Bruker ER200D, USA)로 측정한다. 필요한 시약들은 인산 완충용액(0.1M, pH 7.8)을 용매로 하여 조제하여 인산 완충용액 (0.1M, pH 7.8) 40 μl , hypoxanthin (2.0mM) 50 μl , DETAPAC (5.5mM, diethylene triamine pentaacetic acid) 30 μl , DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide) 30 μl , sample 40 μl , xanthin oxidase 10 μl 를 잘 혼합하여 1분 안에 ESR를 측정한다. 대조군의 과산화 음이온 라디칼 피크의 높이와 시료의 높이를 비교하여 강도 (intensity)로 비교한다.

Polyphenolic compounds 분석

머루액 30g과 동량의 ethyl acetate를 혼합한 후 분별 깔때기에서 ethyl acetate층을 분리, 추출하였으며 이 과정을 3회 반복하여 ethyl acetate 추출물을 합한 후 무수황산나트륨을 가하고 여과하여 회전 진공농축기 50으로 완전히 농축한 후 시액 (0.2M 인산완충액, pH 3.0: 메타놀:물=2:3:15, v/v/v)으로 잘 희석한 용액을 0.45 μm 로 여과한 후 HPLC (Hewlett Packard 1100 series, USA)로 측정하였다. 칼럼은 HP Hypersil ODS column (200 \times 406mm, 40 $^{\circ}$ C), 이동상은 acetonitril: acetic acid: methanol: water(113: 5; 20: 862, v/v/v/v), 검출기는 DAD(280nm), 유속은 1.0ml/min, 주입량은 20 μl 로 하였다. gallic acid, protocatechuic acid, catechin, chlorogenic acid, caffeic acid, syringic acid, epicatechin, 4-methyl catechol, *p*-coumaric acid 등 표준품을 농도별로 조제한 후 검량선을 작성하여 정량하였다 .

결 과

총 페놀 함량

제조 방법을 달리한 머루즙 발효 과정 중 총 페놀 함량 결과이다. 이 총 페놀 함량은 gallic acid equivalent로써 검량 곡선을 이용하여 계산하였다. Fig. 4에서 머루즙의 경우 CM 는 초기 1,425 mg/l gallic acid 이었으며 6일째 1,942 mg/l, 18일째 3,235 mg/l이었으며 NM I은 초기에 2,130 mg/l, 4,027 mg/l, 5,096 mg/l로 나타났다. NM II 초기 1,223 mg/l, 6일째 2,781 mg/l, 18일째 3,081 g/l로 알코올 발효 과정 중 머루즙 내에

phenolic compound의 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 37일째 머루즙 발효조에 상층 액만을 시료로 채취한 총 페놀 함량은 각각 NM은 1,758 mg/l, NM I은 3,812 mg/l, NM II는 2,004 mg/l gallic acid의 함량을 보였다. 머루 씨와 껍질 채 발효한 NM I, NM I의 방법에 50% 물을 첨가한 NM II는 머루즙만 발효한 CM 보다 총 페놀 함량이 높게 나타났다.

ESR에 의한 과산화 음이온 라디칼 소거작용

머루주의 superoxide signal intensity는 CM보다는 NM I, NM II가 작게 나타났고, NM I이 가장 작은 것으로 보아 radical scavenging 효과가 가장 큰 것을 알 수 있다. SOSA value는 NM I > NM II > CM 순이었는데, NM I, NM II는 발효과정이 진행할수록 SOSA value가 증가했고, CM은 증가하다 감소하였다. SOSA value가 가장 큰 NM I의 radical scavenging 효과가 가장 큰 것으로 보인다. 머루주의 발효 과정 중 phenolic content가 가장 큰 18일 째의 radical peak를 나타낸 그림이다. Control보다 CM, NM I, NM II의 peak가 모두 작은 것으로 보아 radical scavenging 효과가 있는 것을 알 수 있고, 각 머루주의 peak는 NM I < NM II < CM으로 NM I의 radical scavenging 효과가 가장 크게 나타났다.

Polyphenolic compounds 함량 변화

HPLC로 머루주의 polyphenol 화합물을 분석한 결과 gallic acid, protocatechuic acid, catechin, chlorogenic acid, caffeic acid, syringic acid, epicatechin, 4-methyl catechol, *p*-coumaric acid의 8가지 물질을 확인 및 관찰하였다. CM에 비해 NM I, NM II에서 총 polyphenolic 화합물 성분 함량이 더 큰 것이 관찰되었다.

감사의 글

이 논문은 1999년도 대산 농촌문화 재단의 학술연구비에 의하여 지원되었음.

참 고 문 헌

1. Hwang, I.K., Ahn, S.Y. (1975) Studies the anthocyanins in wild vines (*Vitis amurnesis*)

- Ruprecht*) Part I. J. Kor. Agri. Chem. Soc. 18: 183
2. Hwang, I.K., Ahn, S.Y. (1975) Studies the anthocyanins in wild vines (*Vitis amurnesis Ruprecht*) Part II. J. Kor. Agri. Chem. Soc. 18: 188
 3. Adams, D. O., Harbertson, J. F. (1999) Use of alkaline phosphatase for the analysis of tannins in grapes and red wines. Am. J. Enol. Vitic., 50: 247
 4. Favretto, D., and R. Flamini (2000) Application of electrospray ionization mass spectrometry to the study of grape anthocyanins. Am. J. Enol. Vitic., 51: 55
 5. Frankel, E.N., Kanner, J., German, B., Parks, E. and Kinsella, J.E. (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. Lancet 341: 454
 6. Griffith, M.J. (1995) A New year's toast to the cardioprotective effects of alcohol. Br. Heart J. 73: 8
 7. Hanasaki, Y., Ogawa, S. and Fukui, S. (1994) The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. Free Rad. Biol. Med. 16: 845
 8. Koh, K. H. and Lee, J. H. (1996) Phenolic content and superoxide radical intensity of Korean wines. Food Sci. Biotechnol. 5: 338
 9. Mirabel, M., C. Saucier, C. Guerra, and Y. Glories (1999) Copigmentation in model wine solutions: Occurrence and relation to wine aging. Am. J. Enol. Vitic., 50: 211
 10. Mitsuta, K., Mitsuta, Y., Kohno, M., Hiramatsu, M. and Mori, A. (1990) The application of ESR spin-trapping technique to the evaluation of SOD-like activity of biological substances. Bull. Chem. Soc. Jpn. 63: 187
 11. Sato, M., Ramarathnam, N., Suzuki, Y., Ohkubo, T., Takeuchi, M. and Ochi, H. (1997) Superoxide radical scavenging activities of wines, and antioxidative properties of fractions recovered from merlot wine pomace, p.359. In: Food Factors for Cancer Prevention. Springer, Tokyo, Japan
 12. Sugui, J. A., K. V. Wood, Z. Yang, C.C. Bonham, and R.L. Nicholson (1999) Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry analysis of grape anthocyanins. Am. J. Enol. Vitic., 50: 200
 13. Sun, B.S., Pinto, T., Leandro, M.C., Ricardo-Da-Silva, J.M., and M.I. Spranger (1999) Transfer of catechins and proanthocyanidins from solid parts of the grape cluster into wine. Am. J. Enol. Vitic., 50: 179
 14. Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H. and Nury, F.S. (1990) Production wine analysis, p.196. Van Nostrand Reinhold, New York, USA