

양조간장에서 분리한 갈색물질의 항산화성

최홍식[†] · 이정수 · 문갑순* · 박건영

부산대학교 식품영양학과

*인제대학교 식품영양학과

Antioxidative Activity of Browning Products Fractionated from Fermented Soybean Sauce

Hong-Sik Cheigh[†], Jeong-Soo Lee, Gap-Soon Moon* and Kun-Young Park

Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

* Dept. of Food Science and Nutrition, Inje University, Kimhae 621-600, Korea

Abstract

Antioxidative activity of browning product (BP) fractionated from fermented soybean sauce (SS) was studied during the oxidation process of linoleic acid mixture system. SSBP was a powder type product prepared from fermented soybean sauce by the fractionation through the Sephadex G-10 column and freeze drying of collected fraction. The aqueous model systems were used for the evaluation of antioxidative activity of SSBP during the oxidative reaction at 50°C by the determination of peroxide and conjugated dienoic acid compounds. The linoleic acid mixture for the aqueous model systems was consisted of linoleic acid (64.6%), oleic acid (27.4%), and other acids in ethanolic phosphate buffer solution (pH 7.0). SSBP had a considerable antioxidative activity with the inhibition of formation of peroxides and conjugated dienoic acids during the autoxidation of linoleic acid mixtures in aqueous model systems. Antioxidative activity of SSBP was relatively higher than SS, however, lower than α -tocopherol and butylated hydroxyanisole. The antioxidative effect of SSBP was increased by the its concentrations from 0.05% to 0.5% in the oxidation reactions of aqueous model systems. Therefore, SSBP was considered as one of the potential natural antioxidants for the use of food products.

Key words : soybean sauce, browning products, antioxidative activity, natural antioxidants

서 론

전보에 의하면 대두와 소맥원료인 발효 조미식품인 양조간장은 리놀레산이 함유된 액상 모델 시스템에서 항산화 특성을 나타내었다¹⁾. 즉, 양조간장은 수소 공여성을 가지며, 과산화물 생성억제, 금속 킬레이터 작용, 리폭시게나아제 활성저해와 같은 작용들을 나타내었다. 이와 같은 양조간장의 항산화작용을 나타내는 원 인물질로는 갈색물질, 아미노산 등의 질소화합물, 인 지질, 토코페롤, 페놀물질 등으로 추정되었다. 이 원인 물질들 가운데 유리 아미노산, 페놀물질, 갈색물질을

양조간장 발효 숙성기간별로 비교 검토하여 항산화작용과의 관련성을 살펴본 결과, 양조간장의 발효 숙성기간이 길수록 가열우육에 대한 항산화성이 높았다. 그리고 항산화 관련 주요 아미노산들의 함량은 숙성에 따라 감소했고, 총 페놀함량도 계속적으로 증가하지 않았으나 갈색도와 환원력은 계속 증가함으로 인하여, 양조간장의 항산화성은 maillard reaction products인 melanoidin 물질과 높은 상관관계가 있다고 사료되었다²⁻⁴⁾.

본 연구는 양조간장에서 항산화성이 큰 획분 즉, 갈색물질을 분획하여 항산화 관련 효과를 검토한 것으로 그 결과를 보고하고자 한다.

[†]To whom all correspondence should be addressed

재료 및 방법

시료의 조제 및 시약

양조간장 및 그 분말의 조제는 전보¹⁾에 의하였으며, 겔 여과 크로마토그래피에 의한 양조간장의 갈색물질의 분리도 전보²⁾에 준하였다. 분취한 각 획분의 갈색도를 측정하여 갈색도가 높은 획분을 모아 동결건조시켜 양조간장 갈색물질(Soybean Sauce Browning Products : SSBP)이라 하였으며, 이를 동결온도 -40°C 에서 급속 동결시킨 후, 수분함량 3% 이하로 동결건조(Virtis Bench Top, Virtis Co., Ltd, USA, 조건 : 진공도 100millitorr내외, 온도 -20°C 이하)시킨 다음 질소가스를 치환한 용기에 밀봉한 상태로 하여 냉동고(-18°C)에 저장하면서 실험에 사용하였다³⁾.

또한, 산화반응에 사용된 지방산은 리놀레산 혼합물(linoleic acid mixture, Fluka Co., Switzerland)이며 이전에 보고한 방법⁴⁾에 따라 지방산 조성을 분석한 결과, 주성분인 리놀레산이 64.6%이며 올레산이 27.4%로 기타 지방산들은 미미하게 함유되어 있었다. 그리고 실험에 사용된 α -토코페롤과 부틸히드록시안니졸(BHA)은 Sigma Chemical Co. (USA)의 것을, 기타는 시약 특급의 것을 사용하였다.

갈색도 및 다투르린 반응 양성물질의 측정⁵⁾

칼럼에 의해 분획된 각 획분의 갈색도는 spectrophotometer(Bausch & Lomb Spectronic 88, USA)를 사용하여 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 다투르린 반응 양성물질의 측정은 1% 다투르린 용액 1ml와 각 분획 1ml를 혼합하여 100°C 에서 30분간 가열시킨 후, 유수에서 냉각시켜 spectrophotometer(Cecil CE 292, England)를 사용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

과산화물가 및 conjugated dienoic acid량의 측정

과산화물가의 측정⁶⁾은 100ml 삼각플라스크에 linoleic acid mixture 1.00g을 정칭한 후, ethanol 20ml을 가해 linoleic acid을 녹이고 0.2M 인산완충용액(pH 7.0) 25ml를 가해 혼합하였다(이때 첨가하는 항산화제는 용해성에 따라 ethanol 혹은 인산완충용액에 용해시켜 해당농도로 조제한 후 1ml첨가). 그리고 50°C 항온기에서 정해진 반응시간 동안 산화시킨 다음 통상의 방법에 따라 과산화물가를 분석하였다. 한편, conjugated dienoic acid 생성량의 측정⁷⁾은 isooctane 10ml에 기질

용액 0.2ml를 첨가하여 잘 혼합한 후, 233nm에서 흡광도를 측정하여 공식에 따라 산출하였다. 기질용액은 과산화물가 측정시 chloroform으로 추출하여 모은 하층액을 사용하였다.

결과 및 고찰

Sephadex G-10에 의한 갈색물질의 분획

Sephadex G-10을 충전한 칼럼에 양조간장 농축액(50%) 0.5ml를 유출시킨 후 각 획분에 대해 갈색도 및 다투르린 반응을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 갈색도가 가장 높은 획분은 획분번호 11, 12이었으며 이 획분들에는 고분자 melanoidin색소 성분이 주로 함유된 것으로 사료되었다⁸⁾. 본 실험에서는 갈색도가 가장 높은 획분번호 11, 12를 모아 동결건조시켜 항산화 효과를 비교 검토하는데 사용하였다.

분리된 각 획분의 다투르린 용액과의 반응은 2개의 peak가 나타남을 알 수 있으며, 갈색물질의 다투르린 양성 반응은 간장색소 중의 질소화합물에서 유래되며 획분번호 15~20사이의 양성 반응은 간장의 저분자 펩티드와 아미노산에 의한 것으로 추정된다⁹⁾. 그러므로 양조간장의 갈색물질에는 저분자 펩티드와 아미노산은 거의 함유되어 있지 않을 것으로 사료된다. 간장의 갈색물질은 비효소적 갈변반응 및 효소적 갈변반응에 의해 생성되며, 특히 maillard reaction에 의하여 간장숙성 중

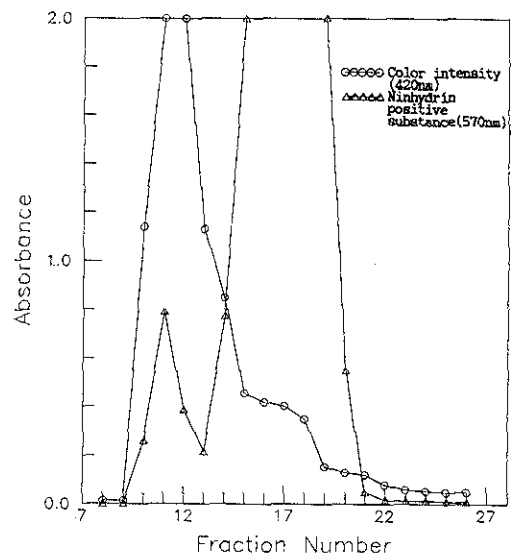


Fig. 1. Fractionation of the soybean sauce by Sephadex G-10 column chromatography.

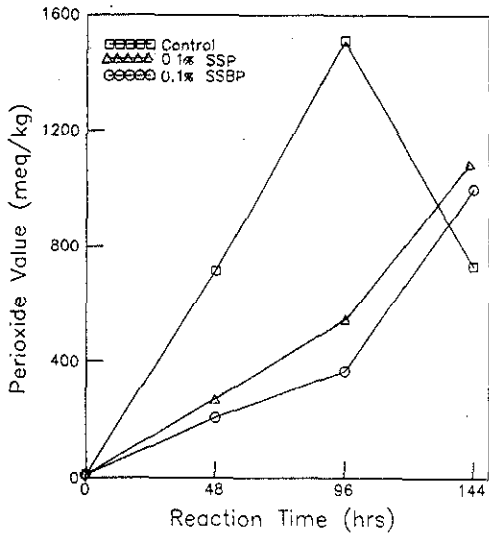


Fig. 2. Changes of peroxide values during the autoxidation of linoleic acid mixture with addition of soybean sauce powder(SSP) and soybean sauce browning product (SSBP) at 50°C.

또는 가열과정 중에 형성되는 것으로 알려지고 있다⁹⁾.

양조간장 및 양조간장 갈색물질의 항산화 효과

Linoleic acid mixture에 동일한 농도 수준인 0.1% 농도의 양조간장(Soybean Sauce : SS)과 양조간장 갈색물질(Soybean Sauce Browning Product : SSBP)를 첨가하여 50°C에서 산화반응을 시켰을 때, 이들 물질의 항산화 효과를 비교 검토한 결과는 Fig. 2와 같다. 즉, 대조구의 경우는 반응 시간이 경과함에 따라 과산화물가가 현저하게 증가하였는데, 이 결과는 유사한 조건인 50°C, 48시간 동안 ethyl linoleic acid를 자동산화 시켰을 때와 거의 유사한 과산화물가 변화 양상을 나타내었다¹⁰⁾. 반응 144시간 일때 대조구는 이미 과산화물 분해가 일어나고 있었으나, SSBP와 SS 첨가구에서는 과산화물 생성이 점차적으로 증가하고 있었다. 그리고 SSBP 첨가구가 SS 첨가구보다 과산화물 생성에 대한 저해효과가 더 크게 나타났는데, 이 결과는 Yamaguchi 등¹¹⁾이 양조간장의 갈색도와 항산화성 간에 상관관계가 있다는 보고와 일치하는 경향을 보여주었다.

양조간장 갈색물질의 농도별 항산화 효과

Linoleic acid mixture에 0.05, 0.1, 0.5% 농도의 SSBP를 첨가하여 50°C에서 144시간 동안 산화반응을 시켰을 때, SSBP의 항산화 효과는 Fig. 3과 같다. 반응 144시간 일때 대조구는 과산화물의 급격한 증가 이후

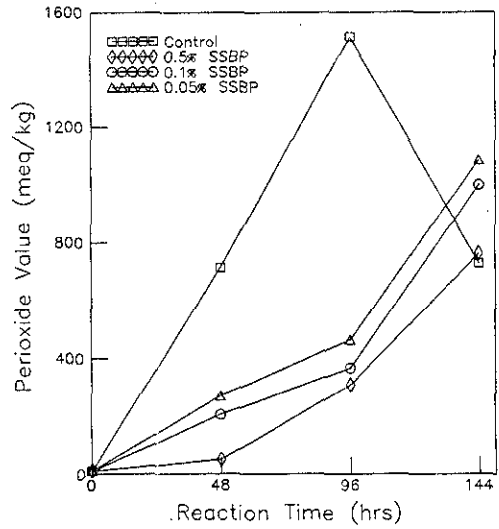


Fig. 3. Changes of peroxide values during the autoxidation of linoleic acid mixture with addition of SSBP at 50°C.

이미 과산화물 분해가 일어나 2차 산화 생성물을 형성하여 결과적으로 과산화물 분해율이 생성율을 능가한 것으로 추정되며¹²⁾, Miyashita와 Takagi¹³⁾는 유리 지방산들이 해당 지방산의 methyl esters보다 더욱 빠르게 자동 산화되고, 또 반응시간이 경과함에 따라 과산화물의 축적과 감소를 보고한 바 있었다. SSBP 첨가구에서는 0.05, 0.1, 0.5% 농도순으로 과산화물 생성량의 저해효과를 나타내고 있다. 그러므로 SSBP는 SS와 마찬가지로 첨가 농도가 높을수록 항산화 효과도 증가는 것으로 판단되며, 이런 항산화제는 개시 단계에 첨가될 때, 실제로 효과적이라고 보고¹⁴⁾되어왔다.

Melanoidins의 항산화 메커니즘은 아직도 분명하게 알려지지 않으며, 반응물질 및 반응 조건에 따라 항산화력은 서로 다른 양상을 나타내고 있다. 그리고 지금까지 알려진바에 의하면, melanoidins 등의 갈색물질의 항산화력은 자신이 지니고 있는 수소 또는 전자 공여성이나 금속 착화합물 형성 특성에 의한 것이라고 보고되고 있다¹⁴⁾.

양조간장 갈색물질과 다른 항산화제와의 과산화물가 비교

SSBP, BHA 그리고 α -토코페롤의 항산화 효과를 동일한 농도 수준(0.05%)에서 비교하였으며, 이 때 산화 조건은 50°C, 48시간, 기질로는 linoleic acid mixture가 역시 사용되었다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 3종의 항산화물질은 그 효과가 차이가 나며 Duncan의 multiple range test방법¹⁵⁾에 따라 통계처리한 결과, 반응 48

시간 일때 5% 수준에서 상호간 유의적 차가 있었다. 그리고 과산화물 증가에 대한 저해 효과는 BHA, α -토코페롤, SSBP순으로 높았다. 그리하여 본 실험의 SSBP는 기존의 합성 항산화제와는 효과면에서 차이가 있으나, 대조구와 비교시 그 항산화 효과가 현저하다고 사료된다.

한편, 동일한 농도 수준에서 melanoidin은 linoleic acid의 자동산화에서 BHA와 거의 동일한 수준의 항산화성을 보였다는 보고¹⁶도 있으나 본 실험의 SSBP는 BHA와 현저한 차이가 있었다. 이것은 melanoidin의 특정 획분과 갈색복합 물질과의 차이에서 온 결과라고 생각된다. 그리고 0.05% 농도의 BHA 경우, 과산화물 억제효과가 강력하고 지속적인을 알 수 있었으며¹⁶, α -토코페롤의 경우는 면실유의 0.05~0.07% 농도에서 최대 항산화 효과를 나타낸다고 하나 고농도 즉, 0.1% 이상의 농도에서는 산화촉진인으로 작용하는 보고¹⁷

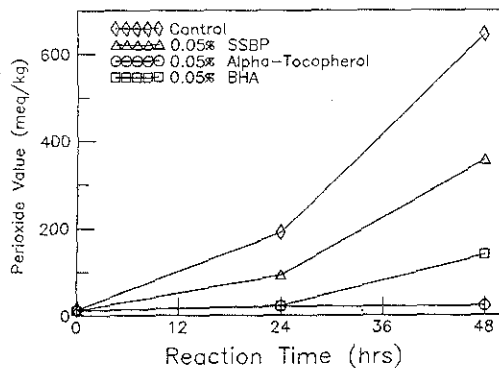


Fig. 4. Effect of SSBP, α -tocopherol and BHA on the peroxide value changes during the autoxidation of linoleic acid mixture at 50°C.

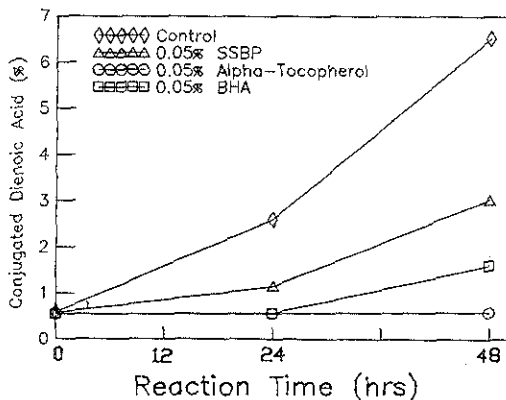


Fig. 5. Effect of SSBP, α -tocopherol and BHA on the conjugated dienoic acid value changes during the autoxidation of linoleic acid mixture at 50°C.

도 있었다. 본 실험에 사용된 α -토코페롤은 0.05%의 농도 수준이므로 항산화제로써 과산화물의 생성을 저해시키는 작용을 하였다고 추정된다.

양조간장과 다른 항산화제와의 conjugated dienoic acid 생성량의 비교

SSBP, BHA 그리고 α -토코페롤을 앞에서 살펴 본 과산화물이 비교에서의 같은 방법으로 linoleic acid mixture에 첨가하여 conjugated dienoic acid 생성량을 살펴 본 결과는 Fig. 5와 같다. 대체로 과산화물이 비교에서와 유사한 경향을 나타내고 있으며, Duncan의 multiple range test 방법에 따라 통계 처리한 결과, 반응 48 시간 일때, 1% 수준에서 SSBP, BHA 및 α -토코페롤은 상호 간에 유의적 차가 있었다. 즉, BHA가 가장 강한 conjugated dienoic acid 생성 저해 능력을 그 다음 α -토코페롤, SSBP순으로 억제 능력을 보였다. 이에 반해 대조구의 경우 전술한 항산화 물질 첨가구보다 빠른 속도로 conjugated dienoic acid의 생성량이 증가 하였으므로, 초기단계에서 부터 현저한 지방산의 산화 현상을 추정할 수 있었다²¹. 그러므로 SSBP, BHA 그리고 α -토코페롤과의 항산화 효과를 비교한 결과, BHA > α -토코페롤 > SSBP순으로 효과가 크다. SSBP가 대조구보다는 현저한 항산화 효과를 나타내기 때문에, 또 천연 항산화제로 비교적 많은 양을 첨가할 수 있는 발효 조미식품인 점에서 SSBP는 항산화물질로서 중요한 의의를 가질 것으로 사료된다.

요 약

동결건조한 양조간장의 분말로 부터 갈색물질을 Sephadex G-10으로 겔-여과 크로마토그래피법에 의하여 분획한 다음 이를 동결건조하여 분말로 만든 후, 동갈색물질의 항산화력을 다른 항산화제인 부틸히드록시아니솔(BHA) 및 α -토코페롤과 비교하여 보았다. 갈색물질 및 양조간장은 다 같이 지방산의 산화반응에 있어서 과산화물의 생성을 크게 저해시켰고, 갈색물질이 양조간장 자체보다 항산화 효과가 더 높았으며 농도에 비례하여 항산화성이 증대되었다. 그러나 갈색물질의 항산화력은 과산화물 생성억제 능력 그리고 conjugated dienoic acid 생성저해 능력 등에서 BHA 및 α -토코페롤 보다는 낮았다. 이와같은 양조간장의 갈색물질의 항산화성은 그 획분이 대량 섭취되고 있는 발효조미식품이라는 점에서 중요한 의의를 가질 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 1988년도 학술진흥재단(자유공모과제)의 지원에 의해 수행된 결과이며 이를 감사 드립니다.

문헌

1. 최홍식, 이정수, 문갑순, 박진영 : 지방산의 산화에 대한 양조간장의 항산화 특성. 한국식품과학회지, **22** (3), 332 (1990)
2. 문갑순, 최홍식 : 양조간장의 항산화 작용 및 항산화성 물질에 관한 연구. 한국식품과학회지, **19** (6), 537 (1987)
3. 이정수 : 양조간장에서 분리한 갈색물질의 항산화성에 관한 연구. 부산대학교 석사학위논문 (1989)
4. Lingnert, H. and Waller, G. R. : Stability of antioxidants formed from histidine and glucose by the maillard reactions. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 27 (1983)
5. 김상달, 도재호, 오훈일 : 고려인삼 갈변물질의 항산화 효과. 한국농화학회지, **24** (3), 161 (1981)
6. Hayase, F. and Kato, H. : Antioxidative components of sweet potatoes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **30**, 37 (1984)
7. A.O.C.S. : *Official and tentative method*. Illinois (1973)
8. Yamaguchi, N., Koyama, Y. and Fujimaki, M. : Fraction and antioxidative activity of browning reaction products between D-xylose and glycine. *Prog. Food. Nutr. Sci.*, **5**, 429 (1981)
9. 최홍식 : 간장의 풍미성분 및 안전성 관련 성분. 한국간장에 관한 심포지엄, 한국농화학회지 영남지부, p. 29 (1988)
10. Cho, S. : Antioxidative activity of tocopherol analogues in a food model system. *J. Jpn. Home Economics*, **34**, 39 (1983)
11. Yamaguchi, N., Yokoo, Y. and Fujimaki, M. : Antioxidative activities of miso and soybean sauce on linoleic acid. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **26** (2), 71 (1979)
12. Gardner, H. W. : Decomposition linoleic acid. *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 129 (1975)
13. Miyashita, K. and Takagi, T. : Study on the oxidative rate and prooxidant activity of free fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **63** (10), 1380 (1986)
14. 최홍식, 이창용 : Melanoidin의 항산화성 및 항돌연변이원성. 한국영양식량학회지, **22** (2), 246 (1993)
15. Bermond, E. : in "Methods for sensory evaluation", Canada Dept. of Agric., Publication 1284 (ed.), Ottawa, p.19 (1970)
16. Branen, A. L. : Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **52**, 59 (1975)
17. Cillard, J. and Cillard, P. : Behavior of alpha, gamma, and delta tocopherols with linoleic acid in aqueous media. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **57**, 39 (1980)

(1993년 2월 9일 접수)