

자소자 항산화성분의 분리

김용재 · 김충기 · 권용주
전북대학교 식품공학과

Isolation of Antioxidative Components of *Perillae semen*

Yong-Jae Kim, Choong-Ki Kim and Yong-Ju Kwon

Department of Food Science & Technology, Chonbuk National University

Abstract

Free phenolic acids (FPA), soluble phenolic acid esters (SPA) and insoluble-bound phenolic acids (IPA) were extracted from defatted *Perillae semen* flour and the antioxidative components in FPA extract was separated by column chromatography and HPLC. Total phenolic content of defatted *Perillae semen* flour was 0.38% as chlorogenic acid and each percent ratio of the content of FPA, SPA and IPA to total phenolic content was 71.1%, 15.8% and 13.1%, respectively. The antioxidative activity was compared by measuring of electron donating ability (EDA) and thiobarbituric acid value (linoleic acid substrates). The FPA extract was showed the highest antioxidative activity among the three kinds of phenolic extracts. The FPA extract showing the highest antioxidative activity was separated by silica gel column chromatography and then the separated fractions were compared in terms of antioxidative activity. The fractions of acetone : methanol (8 : 2) showing the highest antioxidative activity was further separated by HPLC. Five fractions (F-I, F-II, F-III, F-IV and F-V) were observed on the HPLC chromatogram and F-I fraction showed the highest antioxidative activity.

Key words: defatted *Perillae semen*, free phenolic acids, antioxidative components

서 론

지방질 및 지방질 함유식품의 가공 또는 저장 중에 일어나는 지방질의 산화는 악취를 내고 필수지방산과 지용성 비타민의 손실을 일으켜 식품의 품질을 저하시킬 뿐만 아니라, 산화에 의해 생성되는 여러 종류의 alcohol류, aldehyde류, ketone류 등의 산화생성물들이 생체 내에서 DNA를 손상시키거나 암을 유발하기도 하며, 세포의 노화에도 관련이 있는 것으로 알려져 있다⁽¹⁾. 이와같은 지방질의 산화를 억제하기 위해서 산소제거, 자외선 차단, 항산화제 첨가 등과 같은 방법을 이용할 수 있으나, 이중 널리 이용되고 있는 방법은 항산화제를 직접 유지에 첨가하는 것이다. 현재 가장 많이 사용하고 있는 항산화제로는 천연 항산화제인 tocopherol과 합성 항산화제인 propyl gallate, BHA, BHT, TBHQ 등이 있다. 이들 항산화제는 산소존재나 고온조건에서 기질의 유리 라디칼 생성을 지연시키거나 활성을 저해하므로써 지방질의 산화를 억제시켜

주는데 합성 항산화제는 탁월한 효과와 경제성 때문에 폭넓게 사용되고 있으나 이들의 인체에 대한 안전성에 문제^(2,3)가 있으며, 천연 항산화제로 널리 알려진 tocopherol은 안전하기는 하나 단독으로는 산화 연쇄 반응 저지 능력이 낮고⁽⁴⁾ 가격이 비싼 단점이 있다. 따라서 근래에는 보다 안전하고 항산화효과가 뛰어난 천연 항산화제를 개발하기 위해 많은 연구가 주로 각종 향신료^(5,6)를 비롯하여 생약^(7,8), 식용식물^(9,10) 및 식물종자^(11,12,13) 추출물 등에서 활발히 이루어지고 있다.

자소(紫蘇; *Perilla frutescens* Britton var. *crispa* Decne.)는 꿀풀과(Labiata)에 속하는 들깨와 유사한 1년생 초본식물로서 자소의 종자인 자소자(紫蘇子; *Perillae semen*), 자소경(紫蘇莖; *Perillae ramulus*), 자소엽(紫蘇葉; *Perillae folium*) 등이 모두 약용⁽¹⁴⁾으로 많이 이용되고 있으며, 향료, 조미료, 강장제, 식용색소 및 화장품 색소원료^(15,16)로도 이용되고 있다. 이러한 자소에 관한 연구로는 자소의 정유성분⁽¹⁷⁾, 여러종류의 자소엽에 대한 정유성분⁽¹⁸⁾, 자소엽의 휘발성 성분⁽¹⁹⁾, 지질의 특성 및 지방산 조성⁽²⁰⁾, Sterol의 조성⁽²¹⁾ 등 화학적 조성에 관한 연구가 많이 이루어져 있으나 자소자로부터 항산화성분을 분리하고자 시도한 연구는 아

Corresponding author: Yong-Ju Kwon, Department of Food Science & Technology, Chonbuk National University, Dukjin-dong, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea

Gum질, 지방질 및 활성 Gluten첨가에 따른 쌀빵 특성 비교

강미영 · 최영희 · 최해춘*

경북대학교 사범대학 가정교육과, *농촌진흥청 작물시험장

Effects of Gums, Fats and Glutens Adding on Processing and Quality of Milled Rice Bread

Mi-Young Kang, Young-Hee Choi and Hae-Chune Choi*

Department of Home Economics, Teachers' College, Kyungpook National University

*National Crop Experiment Station, Rural Development Administration

Abstract

Fermentation and morphological characteristics of rice bread baked with gums, lipids, and glutens added dough were investigated to establish the standard recipe for rice bread processing. All gum-type additives led to successful formation of rice bread. Hydroxypropyl-methyl-cellulose among tested gums showed the best volume expansion and successful formation of rice bread. Addition of vegetable oils gave better effect on increasing the specific loaf volume and tenderness of rice bread than addition of the solid-type lipids such as margarin and lard during rice bread processing. Dry heating during baking of the rice bread gave more desirable effect on specific gravity of rice bread than wet heating. High-amylose rices such as Suweonjo, AC 27, and IR 44 showed better formation of rice bread in the case of adding 3% hydroxypropyl-methyl-cellulose, while Suweon 230 and Pusa-33-30 showed slightly better formation of rice bread in the case of adding the gluten and strong hard flour. The glutinous rice Hangangchalbyeon failed to the formation of rice bread in both cases of adding 3% hydroxypropyl-methyl-cellulose and the gluten and hard flour.

Key words: rice bread processing, gums, gluten, lipids

서 론

우리 나라 농업의 기간작물인 쌀은 주로 밥으로써 소비되며, 술·떡·과자등과 같이 가공식품의 형태로 소비되는 양은 전체 쌀 소비량의 5% 정도에 불과하다. 그리고 예로부터 쌀로 만들어져 전해 오는 전통 가공식품들도 명절이나 혼·상·제례시에 쓰이는 고급음식으로 이용되고 있기는 하지만 취반용 멥쌀이나 찰쌀로 제조되므로 음식의 종류나 품질의 다양성 면에서는 어느 정도 제한을 받고 있다고 할 수 있겠다. 우리의 생활수준이 향상됨에 따라 식품에 대한 소비자들의 기호성이 다양해지고 고급화되면서, 조리가 간편하고 미각에 대한 기호도가 높은 가공식품을 선호하는 경향이 있어, 빵류는 그 조직감(물성) 및 섭취의 편의성 때문에 여러 곡류 가공식품 중에서 밥에 버

금갈 정도의 소비가 이루어지고 있는 가장 보편적인 식품이다.

쌀로서 빵을 만들고자하는 시도는 밀빵에 대해 알려지성을 나타내는 사람들을 위하여 일찍부터 검토되었었다⁽¹⁻⁶⁾. 그러나 쌀에는 밀에 함유되어 있는 것과 같은 gliadin이나 glutenin 등의 prolamin류의 단백질 함량은 적고 glutelin류의 단백질이 주종을 이루고 있기 때문에⁽⁷⁾ 밀 gluten과 같이 반죽의 망상구조를 형성하지 못한다. 그러므로 이러한 점을 보완하기 위해서 활성 gluten⁽⁸⁾, 계면활성제인 glyceryl monostearate⁽⁹⁾, gum질인 carboxymethyl cellulose, guar gum, methyl cellulose, xanthan gum, locust bean gum⁽¹⁰⁻¹²⁾ 등의 gluten 대체 재료들을 첨가함으로써 빵과 유사한 조직감을 가지는 발효 쌀빵 제조가 가능하였다. 우리 나라에서도 쌀가루에 gum질과 설탕·소금·이스트 등을 배합해서 만든 쌀빵 프리믹스가 개발되어 쌀식빵의 제조에 이용되고 있다.

이에 본 연구에서는 이러한 기존 결과를 참고로하

Corresponding author: Hae-Chune Choi, National Crop Experiment Station, Rural Development Administration, Suwon 441-100, Kyunggi-do, Korea

여 쌀빵 제조방법을 개선하고자 gum질, 지방질 및 활성 gluten 첨가에 따른 쌀빵 특성을 비교하였고 확립된 쌀빵 제조법을 이용하여 쌀의 형태 및 이화학적 특성이 다양한 벼 품종을 공시하여 품종별로 첨가물에 따른 쌀빵의 제빵성을 비교하였다.

재료 및 방법

공시품종

통일형 다수확 품종을 비롯한 농안벼(수원 392호), 낙동벼, 수원 232, AC 27, 대립벼 1호(수원 391호), IRAT 177, 중원벼, 수원 230, T(N)1, 수원조, Pusa-33-30, IR 44, IR 841-76-1, 한강찰벼의 쌀은 농촌진흥청 작물시험장으로부터 제공받았고, 쌀빵 제조법 확립을 위한 쌀은 일반미를 시중에서 구입하여 실험에 사용하였다. 기타 원부재료인 gum류(hydroxypropyl-methyl-cellulose, xanthan gum, guar gum, carageenan, locust bean gum)는 Sigma사로부터 구입 사용하였고, sericin은 경북대 농대 천연섬유화학과로부터 제공받았으며, gelatin·한천·강력분·소금·탈지분유·식용유·설탕은 각각 시판품을 사용하였으며, 계란은 실험당일 구입하여 신선한 것으로 사용하였다.

쌀가루 및 쌀빵제조

쌀을 상온에서 약 15시간 동안 수침 후, roller mill로 습식 제분시킨 쌀가루를 40°C에서 충분히 건조시켜 다시 food mixer (대원 food mixer, DWN-501)로 재분쇄하여 100 mesh의 체를 통과시킨 분말을 쌀가루시료로써 실험에 사용하였다.

쌀빵은 예비실험을 통하여 쌀가루 및 원부재료의 조성비, 반죽방법, 발효조건, 가열조건 등을 검토하여 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 쌀가루(75 g), 설탕(12 g), 탈지분유(1.5 g), 소금(0.75 g), 식용유(7.5 g), 계란액(4.5 g)을 잘 섞은 후, 물 72 mL에 적당량의 gum질을 첨가하여 팽윤시켜 둔 것과 따뜻한 물에 활성화시켜 둔 이스트(3 g)액 18 mL을 첨가하여 잘 섞으면서 반죽하였으며, 활성 gluten을 첨가하는 경우에는 쌀가루(48 g), 활성 gluten (10 g), 강력분(16 g), 설탕(12 g), 탈지분유(1.5 g), 소금(0.75 g), 식용유(7.5 g), 계란액(4.5 g)을 잘 섞은 후 활성화시킨 효모(3 g)액 56 mL을 첨가하여 반죽하였다. 쌀빵 반죽을 빵틀(13×5.5×4.5 cm)에 성형하여 30°C에서 1.5시간 발효시켜, 200°C에서 5분간 구운 후 온도를 180°C로 낮추어서 15분간 더 굽는다. 각 처리별 쌀빵 제조는 3반복을 실시하였다.

발효 및 제빵 특성조사

쌀빵 반죽의 발효에 따른 부피 증가율은 발효전 비이커에 반죽의 높이를 표시하여 두고 일정시간 발효시킨 후 증가된 반죽의 높이를 측정하여 부피를 계산하여 산출하였다.

쌀빵의 비용적 측정은 쌀빵을 제조하여 1시간 정도 방냉 후, 1 cm³크기로 잘라 무게를 측정하여, 무게에 대한 부피의 비로서 표시하였다.

결과 및 고찰

Gum질의 종류에 따른 제빵성 비교

쌀은 밀의 gluten과 같이 제빵과정에서 반죽의 망상구조를 형성시키지 못하므로 쌀빵을 제조하기 위해서는 gluten대체 재료가 반드시 첨가되어야 한다. Dough란 단백질, 전분입자, pentosan, 지질, 수용성 gum질, 물 등의 여러 성분으로 이루어진 분산계를 지칭하는데, 어떤 반죽이 dough망상구조를 형성하기 위해서는 반죽 구성성분의 분산계에 mixing이라는 기계적인 에너지의 첨가 및 그에 수반되는 구성성분들의 산화과정의 결과 형성되는 것이라 할 수 있다. 반죽에 함유되어 있는 각종 성분들은 모두다 dough의 물성에 영향을 미치지만 특히 gluten단백질(gliadin 과 glutenin)이 dough 물성에 대한 중심적인 역할을 하고 있으며, 다른 성분들은 단백질과의 상호작용에 의해서 dough의 물성에 영향을 미치고 있다. 즉 단백질 분자의 적당한 회합에 의한 망상구조 형성이 결과적으로 dough의 물성을 부여하는 것이라는 관점에서, 본연구에서는 gum질이 형성하는 망상구조로써 gluten dough

Table 1. Effect of gums on expansion of batters and specific volume of rice bread

Gums	Conc. of gums (%)	Expansion ratio of dough	Specific loaf volume (mL/g)
Hydroxypropyl-methyl-cellulose	1.5	3.69 ^a	4.09 ^a
Guar gum	1.0	1.56 ^c	1.41 ^c
Locust bean gum	1.5	2.35 ^b	2.07 ^b
Carrageenan	1.0	1.55 ^c	1.40 ^c
Xanthan Gum	1.0	1.33 ^c	1.40 ^c
Sericin1)	1.5	2.06 ^b	1.47 ^c
Gelatin1)	1.5	1.72 ^{bc}	1.54 ^c
Agar	1.0	2.16 ^b	1.79 ^{bc}

^{a-c}Values with different superscript on the same column are significantly different (p<0.05).

¹⁾Sericin and gelatin are not gums but proteins forming gel when swelled in water.

의 대체재료로 삼아 제빵성을 검토하였다.

여러 종류의 gum질을 첨가하여 쌀빵을 제조하면서 반죽의 부피 증가율, 제조된 쌀빵의 비용적을 측정하여 Table 1에 나타내었다.

Table 1에 제시한 각 gum질의 농도는 예비실험시 가장 제빵성이 좋았던 농도들이다. 본 연구에 사용한 hydroxypropyl-methyl-cellulose는 4000 cp를 사용하였다. Sericin 및 gelatin은 복합다당류가 아니고 단백질이지만 이들을 물에 팽윤시켰을 때 gel을 형성하는 특성이 있으므로 검토하였다. Sericin은 제사과정에서 폐기되는 단백질이지만 구성 아미노산 중 serine이 약 30%를 차지하고 있어⁽¹³⁾ serine 잔기(-OH)에 의한 가교 결합력 및 보습효과를 이용하여 기능성 식품개발 및 식품 가공에의 응용 등이 긍정적으로 검토되고 있는 유용자원이므로 쌀빵의 가공성 검토에 사용하였다.

Gum질의 종류에 따라 쌀빵의 가공성이 다르기는 하지만 Fig. 1에 나타내고 있는 바와 같이 쌀빵의 제조는 가능하였으며, 특히 hydroxypropyl-methyl-cellulose를 첨가한 경우에 제빵성이 두드러지게 좋았다. 이에 hydroxypropyl-methyl-cellulose의 함량을 달리하여 쌀빵을 제조하면서 반죽의 부피 증가율, 제조된 쌀빵의 평균정을 및 비용적을 측정하였더니 Table 2에 나타내고 있는 바와 같이 hydroxypropyl-methyl-cellulose의 농도를 3%로 하였을 때 높은 수치를 나타내었으며,

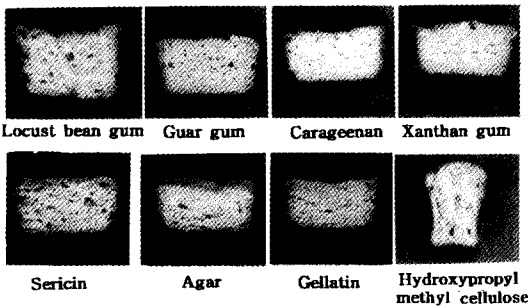


Fig. 1. Effect of gums on rice bread.

Table 2. Effect of increasing amounts of 4000 cp hydroxypropyl-methyl-cellulose in rice bread on expansion ratio of batter and specific loaf volume of rice bread

Hydroxypropyl-methyl cellulose (%)	Expansion ratio of dough	Specific loaf volume (ml/g)
1.0	2.45 ^b	2.67 ^b
1.5	3.69 ^a	4.09 ^a
3.0	3.81 ^a	4.49 ^a
4.5	3.64 ^a	4.25 ^a

^{a,b}Values with different superscript on the same column are significantly different (p<0.05).

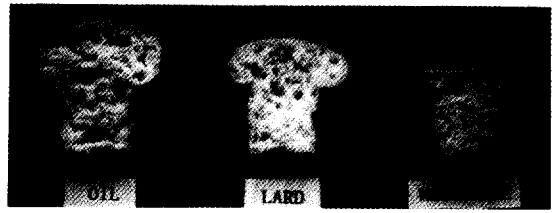


Fig. 2. Effect of fat and oil on rice bread.

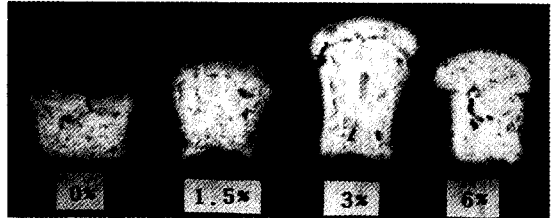


Fig. 3. Effect of hydroxypropyl-methyl-cellulose level on rice bread.

쌀빵 단면의 모양(Fig. 3)도 가장 좋았다. Nishita 등도 쌀빵제조에 hydroxypropyl-methyl-cellulose가 가장 유용한 gum질 첨가제임을 지적한 바 있다⁽¹¹⁾.

첨가 지방질 종류에 따른 제빵성 비교

일반적으로 제빵성 dough형성능 증진 및 빵의 조직감 증진을 위하여 약 3% 내외의 지방질을 첨가한다. 쌀빵제조시 이들 지방질의 효과가 어떠 할지에 대해서 검토하였다. Gluten 대체재료로써 hydroxypropyl-methyl-cellulose를 사용하였고 지방질로서 식용유, 라아드, 마아가린을 각각 첨가하여 제조한 결과 Fig. 3에 나타낸 바와 같이 빵의 성형성 및 조직감은 마아가린이나 라아드와 같은 실온에서 고체상의 지방을 첨가하는 편이 좋은것 같으나, 빵이 잘 부풀지 않고 딱딱한 경향이 있었다. 이에 쌀 품종별 쌀빵제조시에는 첨가하는 지방질로서 식용유를 사용하였다. Nishita 등⁽¹¹⁾에 의하면 밀빵의 품질개선에 효과적이라고 알려진 합성유지나 계면활성제는 쌀빵에서는 반대효과를 나타내었고 정제식용유가 쌀빵조직감이나 용적팽창개선에 효과적이었다고 한다.

활성 gluten첨가에 의한 제빵성 검토

쌀 품종별 제빵성을 비교하기 위해서 Yamamoto 등⁽⁹⁾의 방법에 따라 쌀가루, 강력분, 활성 gluten을 각각 65, 20, 15의 비율로 첨가하여 제조방법에 따른 제빵성을 검토하였다. Gluten 대체재료로써 gum질을 첨가할 때와 달리 강력분 및 활성 gluten 첨가의 경우에는

Table 3. Comparison of specific gravity of rice bread among different mixing times

Mixing times	Specific gravity (cm ³ /g)	
	Dry heating	Wet heating
30	1.29 ^c	1.04 ^c
50	1.44 ^{bc}	1.18 ^{bc}
100	1.46 ^{bc}	1.24 ^{bc}
200	1.66 ^{ab}	1.25 ^{bc}
300	1.98 ^a	1.43 ^b
500	1.78 ^{ab}	1.77 ^a

^{a-c}Values with different superscript on the same column are significantly different (p<0.05).

반죽시키는 과정이 dough망상구조 형성에 중요한 영향을 미치므로 반죽시 치대는 횟수를 달리하여 제조한 쌀빵의 비용적을 비교하였으며, 아울러 가열 방법으로서 건열가열(구움)과 습열가열(찜)에 의한 차이도 검토하였다. Table 3에서 알 수 있듯이 구움 경우에는 300번, 찜 경우에는 500번 치대었을때 빵의 비용적이 가장 컸다. 그리고 반죽을 치대는 횟수가 많아질수록 쌀빵의 비용적이 커졌으며 건열가열이 습열가열 보다 바람직한 것 같았다.

품종별 쌀의 제빵성 비교

Gluten 대체재료로써 3% hydroxypropyl-methyl-cellulose를 첨가하여 만든 쌀빵을 쌀 품종별로 그 단면 사진을 Fig. 4에 제시하였으며, gluten(15%)과 강력분(20%)를 첨가하여 제조한 쌀 품종별 쌀빵의 단면 사진을 Fig. 5에 제시하였다. 3% hydroxypropyl-methyl-cellulose를 첨가하여 제조한 경우에는 수원조, AC 27,

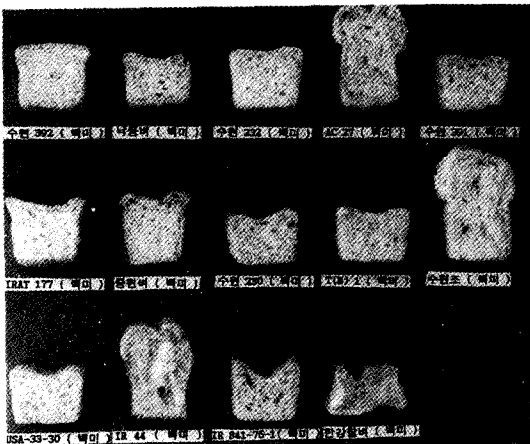


Fig. 4. Varietal difference in sectional status of rice bread added with hydroxypropyl-methyl-cellulose.

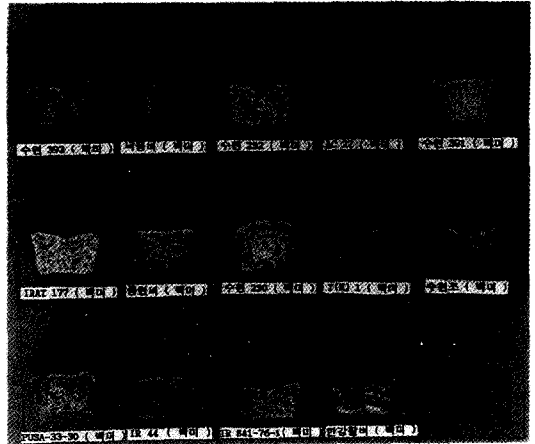


Fig. 5. Varietal difference in sectional status of rice bread added with gluten and hard flour.

IR 44 등의 쌀로 제조하는 경우 제빵성이 상당히 좋은 것 같고, gluten(15%)과 강력분(20%)을 첨가하여 제조하는 경우에는 수원 230 이나 Pusa-33-30 등의 쌀로 제조한 것의 제빵성이 다른 품종의 쌀보다 다소 좋은 경향이였다(Fig. 4, 5). 한강찰벼는 아밀로스를 함유하지 않는 찰벼 품종인데 3% hydroxypropyl-methyl-cellulose나 gluten과 강력분을 첨가한 어느 경우에도 전혀 제빵성형이 이루어지지 않는 결과를 얻었다. 이는 dough망상구조 형성시 전분의 역할에 대해서 심도 깊은 연구의 필요성을 의미하는 결과라 할 수 있겠다. 이와같이 참쌀로써 쌀빵성형이 이루어지지 않았음은 Nishita 와 Bean⁽¹²⁾도 보고한 바 있다. 또한 이들은 아밀로스, 호화온도 및 최종점도에 차이를 보이는 품종 간에 쌀빵의 비용적에서는 별차이를 보이지 않았지만 아밀로스, 호화온도 및 최종점도가 낮은 쌀일수록 빵이 부드러운 특성을 나타내었다고 한다.

요 약

Gluten 대체재료로써 gum질과 지방질 및 활성 gluten을 첨가하여 쌀빵의 특성을 비교 검토 하였다. 실험에 사용한 모든 종류의 gum질 첨가에 의해서 쌀빵의 제조는 가능하였으며, 특히 3% hydroxypropyl-methyl-cellulose를 첨가하여 제조하는 경우 제빵의 성형성이 좋았다. 쌀빵 제조시 첨가하는 지방질로는 상온에서 액체상인 식용유를 사용하는 편이 고체상의 지방인 마아가린이나 라아드 보다 쌀빵의 비용적을 증가시키며, 부드러운 조직감을 부여하고 있었다. 쌀빵 제조시의 가열방법은 습식가열보다는 건식가열이 바람직한

결과를 얻었다.

3% hydroxypropyl-methyl-cellulose를 첨가하여 품종별 쌀로서 빵을 제조한 경우, 한강찰벼를 제외한 모든 품종에서 쌀빵 제조가 가능하였으며, 특히 수원조, AC 27, IR 44 등의 쌀로서 제조한 쌀빵의 성형성은 아주 좋았다. Gluten과 강력분을 첨가하여 제조하는 경우에도 한강찰벼를 제외한 모든 품종에서 쌀빵 제조가 가능하였으며, 수원 230이나 Pusa-33-30 등의 쌀로서 제조한 것이 다른 품종의 쌀보다 제빵성이 좋았다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 산학협동연구 과제 연구비에 의해서 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Kim, J.C. and de Ruiter, D.: Bread from non wheat flours. *Food Technol.*, **22**, 867 (1968)
- Kim, J.C. and de Ruiter, D.: Bakery products with non-wheat flours. *Baker's Digest*, **43**, 58 (1969)
- Kulp, K., Hepburn, F.N. and Lehmann, T.A.: Preparation of bread without gluten. *Baker's Digest*, **48**, 34 (1974)
- Smith, E.B.: Gluten free bread for patients with uremia. *J. Am. Diet. Assoc.* **59**, 572 (1971)
- Smith, E.B.: Development of recipies for low-protein, gluten-free bread. *J. Am. Diet. Assoc.* **65**, 50 (1974)
- Stacy Johnson, F.C.: Utilization of American-produced rice in muffins for gluten-sensitive individuals. *Home Economics Research Journal*, **17**, 175 (1988)
- Julliano, B.O.: *Rice-Chemistry and Technology*, The American Association of Cereal Chemists, Inc., p.117 (1985)
- 山本 淳 : 調理科學, 日本調理科學研究會, **13**, 280 (1980)
- Jongh, G.: The ability of starch to form structures and improving effect of glyceryl monostearate. *Histochemical studies*, **38**, 140 (1961)
- Christansen, D.D., Gardener, H.W., Warner, K., Boundy, B.K. and Inglett, G.E.: Xanthan gum in protein-fortified starch bread. *Food Technol.*, **28**, 23 (1974)
- Nishita, K.D., Roberts, R.L. and Bean, M.M.: Development of yeast-leavened rice-bread formula. *Cereal Chem.* **53**, 626 (1976)
- Nishita, K.D. and Bean, M.M.: Physicochemical properties of rice in relation to rice bread. *Cereal Chem.* **56**, 185 (1979)
- 八杉龍一 等 編 : 岩波 生物學辭典(第4版). 岩波書店, 東京, P. 2027 (1996)

(1997년 1월 23일 접수)

직까지 이루어지지 않았다.

이에 본 연구에서는 탈지한 자소자로부터 free phenolic acid (FPA)류, soluble phenolic acid ester (SPA)류 및 insoluble-bound phenolic acid (IPA)류 형태의 phenol성 물질들을 추출하여 항산화활성을 비교하고, 이중 가장 높은 항산화활성을 나타낸 FPA 추출물에 존재하는 항산화성분을 column chromatography, HPLC 등을 이용하여 분리하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료

자소자는 93년 11월 중순경에 전북 완주군 구이면에서 재배한 것을 시중의 한약방 (전주시 전동 소재 영신당한약방)에서 구입하여 증류수로 세척한 다음 정선하여 상온에서 건조시켜 -10°C의 냉동실에 보관하면서 실험에 사용하였다.

탈지시료의 제조

자소자로부터 탈지시료의 제조는 Fig. 1과 같이 하였다. 즉, 자소자 25 g에 n-hexane 50 mL를 가하여 균질기 상에서 5분간 균질화 시킨 다음 여과하여 잔사를 상온에서 건조시켰으며, 이 과정을 4회 반복하였다. 이와같이 얻어진 잔사를 분쇄하고 425 µm 체를 통과 시킨 후 n-hexane 50 mL를 가하여 균질기 상에서 다시 균질화 시킨 다음 여과하고 이 과정을 2회 반복하였

다. 여과된 잔사를 상온에서 건조시켜 -10°C의 냉동실에 보관하면서 자소자의 탈지시료로 사용하였다.

Phenol성 물질의 추출

Phenol성 물질의 추출은 Krygier 등의 방법⁽²²⁾에 준하여 실시하였다. 즉, 탈지시료 50 g에 70% methanol과 70% acetone (1:1, v/v) 혼합용매 250 mL를 가하여 waring blender 상에서 5분간 추출한 후 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상징액과 잔사로 분리하였다. 이 조작을 5회 반복 실시한 다음 합한 상징액을 200 mL가 되도록 감압농축하여 FPA 및 SPA의 추출에 사용하였으며, 잔사는 IPA의 추출에 사용하였다.

FPA와 SPA를 추출하기 위하여 위의 농축액을 6N-HCl로 pH 2로 조절한 다음 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 침전물을 제거하였고, n-hexane 200 mL로 5회 추출하여 유리 지방산과 지방질 오염물질들을 제거하였다. 수층은 diethyl ether와 ethyl acetate (DE/EA=1:1, v/v) 혼합용매 200 mL로 6회 추출하였으며, sodium sulfate anhydrous로 잔여 수분을 제거하고 감압농축하여 FPA 추출물로 하였다. 한편, SPA를 추출하기 위해서 sodium sulfate를 세척한 물과 FPA 추출시 남은 수층 및 침전물을 혼합하였다. 이 혼합액을 4N-NaOH 200 mL로 질소가스 기류하의 상온에서 4시간동안 가수분해 시킨 후 6N-HCl로 pH 2로 조절한 다음 n-hexane으로 유리 지방산과 지방질 오염물질들을 제거하고 DE/EA 혼합용매로 위와 동일한 방법으로 추출, 농축하여 SPA 추출물로 하였다.

IPA를 추출하기 위해서 70% methanol과 70% acetone (1:1, v/v) 혼합용매로 추출하고 남은 잔사에 4N-NaOH 200 mL를 가하여 질소가스 기류하의 상온에서 4시간동안 가수분해시킨 후, 6N-HCl로 pH 2로 조절한 다음 6,000 rpm으로 원심분리하여 상징액을 n-hexane으로 5회 추출하여 유리 지방산과 지방질 오염물질들을 제거하였다. 이 상징액을 DE/EA 혼합용매로 위와 동일한 방법으로 추출, 농축하여 IPA 추출물로 하였으며, 이상의 각 phenol성 물질들은 15 mL의 methanol에 용해하여 사용하였다.

각 phenol성 물질의 함량 측정

추출된 각 phenol성 물질의 함량 측정은 Rhee 등의 방법⁽²³⁾에 준하여 측정하였다. 즉, 각 phenol성 추출물 0.2 mL에 2% Na₂CO₃ 2.0 mL를 가하여 충분히 혼합하고 2분후에 50% Folin-Ciocalteu's reagent 0.2 mL를 가하여 상온에서 30분동안 방치한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 함량은 chlorogenic acid를 표준물질

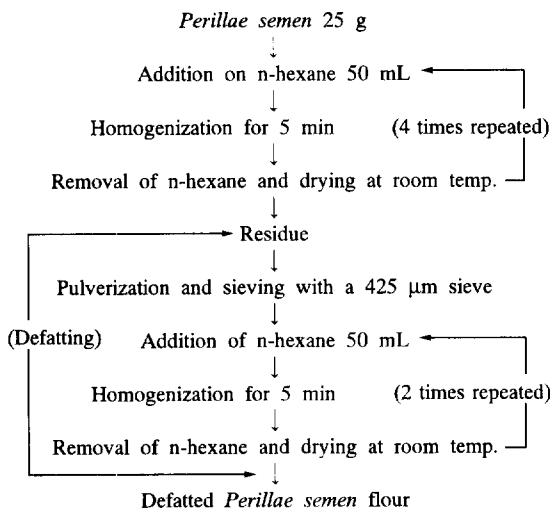


Fig. 1. The schematic diagram of the preparation of defatted *Perillae semen* flour.

로 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 구하였다.

항산화성분의 분리

Column chromatography를 이용하여 항산화성분을 분리하기 위하여 추출된 각 phenolic 물질중에서 항산화활성이 가장 강하게 나타난 FPA 추출물을 silica gel 60 (70~230 mesh, Merck사) 10 g을 acetone으로 헹가시켜 충전한 column (2 cm I.D.×30 cm)에 흡착시킨 후 acetone:methanol 용매계의 비율을 10:0, 8:2, 6:4, 4:6, 2:8, 0:10으로하여 0.7~1.0 mL/min 용출속도로 각각 50 mL씩 분획한 다음 각 획분을 methanol에 용해하여 항산화활성을 측정하였다.

HPLC에 의한 항산화성분의 분리는 column chromatography에 의해서 분리된 acetone:methanol 용매계의 각 획분중 항산화활성이 가장 강하게 나타난 8:2 획분을 0.45 µm membrane filter로 여과한 후 HPLC (KNAUER TYPE 364, Germany)로 분리하였다. 이때 column은 Eurospher 100-C₁₈ (4.0 mm I.D.×250 mm), 온도는 ambient, mobile phase는 acetonitrile:water:acetic acid (12:87:1, v/v/v)를 사용하여 3 mL/min의 유속으로 용출시켜 UV/VIS detector를 사용하여 254 nm에서 chart speed 2.0 mm/min의 조건으로 분석하였다. 또한, HPLC chromatogram 상에서 분리된 각 획분을 분취하여 항산화활성을 측정하였다.

전자공여능에 의한 항산화활성 측정

전자공여능(Electron donating ability, EDA)은 Blois⁽²⁴⁾와 김 등⁽²⁵⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 시료 0.2 mL에 1×10⁻⁴ M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)용액(99.9% methanol에 용해) 2.8 mL를 가한 후 10초간 진탕한 다음 10분간 반응시켜 525 nm에서 흡광도의 감소치를 측정하였다. 이때 전자공여능은 시료첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 백분율로하여 표시하였다.

$$EDA(\%) = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A: 비첨가구의 흡광도

B: 시료첨가구의 흡광도

TBA값에 의한 항산화활성 측정

TBA값은 Mitsuda 등⁽²⁵⁾과 Sidwell 등⁽²⁶⁾의 방법을 참조하여 다음과 같이 측정하였다. 즉, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)와 ethanol을 4:1로 혼합한 용매에 linoleic acid를 0.03 M이 되도록 첨가하여 기질용액으

로 하였다. 이 기질용액 20 mL에 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) 19.2 mL, 1%의 각 시료액 0.8 mL (200 ppm)를 첨가한 후 40±1°C로 유지되는 항온기에서 계속 진탕하여 저장하면서 경시적으로 TBA값을 측정하여 항산화활성을 비교하였다. 측정 방법은 시료액 2.0 mL에 35% trichloroacetic acid 1.0 mL, 0.75% TBA시약 2.0 mL을 가한 다음 30초동안 진탕시켜 95°C 수욕상에서 40분동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 실온까지 냉각시켜 acetic acid 1.0 mL, chloroform 2.0 mL를 가하고, 다시 진탕시킨 후 3,000 rpm에서 5분동안 원심분리한 다음 그 상등액의 흡광도를 532 nm에서 측정하여 이를 TBA값으로 하였다.

결과 및 고찰

Phenolic 물질의 함량

자소자 탈지시료에서 추출한 FPA, SPA 및 IPA 형태의 phenolic 물질의 함량을 chlorogenic acid를 표준물질로하여 측정한 결과는 Table 1과 같았다.

자소자 탈지시료에서 추출한 세가지 형태의 phenolic 물질의 자소자 탈지시료에 대한 함량은 각각 0.27, 0.06 및 0.05%이었으며, 총 phenolic 물질에 대한 세가지 형태의 phenolic 물질이 차지하는 비율은 FPA 추출물이 71.1%, SPA 추출물이 15.8% 및 IPA 추출물이 13.1%로 FPA의 함량이 SPA와 IPA의 함량보다 상당히 많았다. 이러한 결과는 탈지 들깨박⁽¹³⁾에서 추출한 세가지 형태의 phenolic 물질과 그 함량에는 차이가 있으나 비슷한 경향이었다. 한편, 자소자에 대한 phenolic 물질의 총함량은 0.51%로 들깨의 0.83%보다는 적었으나 참깨의 0.27%, 대두의 0.32%보다는 많았다⁽²⁷⁾.

전자공여능에 의한 항산화활성의 비교

자소자 탈지시료에서 추출한 FPA, SPA 및 IPA 형태의 phenolic 물질과 BHA, BHT와의 항산화활성을 전

Table 1. Contents of each type of phenolic acids in the phenolic extracts from defatted *Perillae semen* flour

Phenolic acid type	Phenolic content	
	g/50 g defatted <i>Perillae semen</i> ¹⁾	whole <i>Perillae semen</i> (%)
Free acids	0.27	0.36
Soluble esters	0.06	0.08
Insoluble-bound acid	0.05	0.07
Total	0.38	0.51

¹⁾Phenolic content as chlorogenic acid.

Table 2. Electron donating ability (EDA) of BHA, BHT and phenolic extracts from defatted *Perillae semen* flour

Sample	Electron donating ability (%)	
	100 ppm	
FPA ¹⁾	93.0	
SPA ²⁾	86.2	
IPA ³⁾	87.5	
BHA	82.5	
BHT	76.2	

¹⁾FPA: free phenolic acids.

²⁾SPA: soluble phenolic acid esters.

³⁾IPA: insoluble-bound phenolic acids.

자공여능을 측정하여 비교한 결과는 Table 2와 같았다.

자소자 탈지시료에서 추출한 세가지 형태의 phenol 성 물질을 각각 100 ppm씩 DPPH용액에 첨가한 후 전자공여능을 측정하여 항산화활성을 비교하였을 경우 FPA가 93.0%로 가장 높은 항산화활성을 나타냈으며, SPA와 IPA도 86.2%, 87.5%로 항산화활성이 높게 나타났다. 각 추출물은 BHA (82.5%), BHT (76.2%)보다 활성이 더 높게 나타났으며, BHA가 BHT보다 활성이 높게 나타난 것은 Kurechi 등⁽²⁸⁾의 연구 결과와 일치함을 보여주었다. 특히, FPA의 경우 DPPH용액에 첨가한 후 4분이 경과한 다음에는 흡광도의 변화가 거의 없어 FPA에는 전자를 공여하는 능력이 강한 물질이 존재하는 것으로 생각되었다.

TBA값에 의한 항산화활성의 비교

자소자 탈지시료에서 추출한 FPA, SPA 및 IPA 형태의 phenol성 물질과 BHA, BHT와의 항산화활성을 linoleic acid를 기질용액으로 하여 시간의 경과에 따른 TBA값의 변화를 측정하여 비교한 결과는 Fig. 2와 같았다.

세가지 형태의 phenol성 물질의 항산화활성을 TBA값으로 비교한 결과는 전자공여능으로 비교한 결과와 약간 다르게 나타났다. 즉, FPA의 항산화활성이 가장 높게 나타난 것은 같은 경향이었으나 각 phenol성 물질의 항산화활성 수준은 거의 비슷하였으며, BHA와 BHT의 항산화활성은 각 phenol성 물질의 항산화활성보다 더 높게 나타났다. 이와같은 결과는 phenol기의 OH기가 DPPH용액에 존재하는 자유 라디칼과 linoleic acid의 산화로 인해 생성되는 자유 라디칼에 작용하는 차이 때문이라 생각된다⁽²⁹⁾.

Column chromatography에 의한 항산화성분의 분리 및 확인

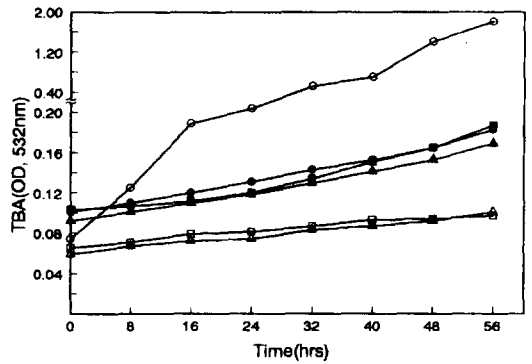


Fig. 2. Changes of the TBA value of linoleic acid substrates containing BHA, BHT and phenolic extracts from defatted *Perillae semen* flour during storage at 40°C. 200 ppm of each sample was used for the measurement. ○—○: control, ▲—▲: free phenolic acids, ■—■: soluble phenolic acid esters, ●—●: insoluble-bound phenolic acids, □—□: BHA, △—△: BHT.

Table 3. Electron donating ability (EDA) of the fractions of free phenolic acids separated by silica gel column chromatography

Solvent mixture	Electron donating ability (%)	
	100 ppm	
acetone : methanol		
10 : 0	53.7	
8 : 2	89.4	
6 : 4	85.1	
4 : 6	77.3	
2 : 8	63.2	
0 : 10	42.2	

자소자에 존재하는 항산화성분을 분리하기 위하여 전자공여능 측정에서 항산화활성이 가장 높게 나타난 FPA 추출물을 silica gel column에 흡착시킨 후 acetone : methanol 용매계로 분획하였다. 각 획분을 100 ppm씩 첨가하여 DPPH용액을 기질로 하여 전자공여능을 측정한 결과는 Table 3과 같았다.

분리된 각 획분중 acetone : methanol의 비가 8 : 2인 획분의 전자공여능이 89.4%로 가장 높은 항산화활성을 나타냈으며, acetone : methanol의 비가 6 : 4인 획분 또한 85.1%의 높은 항산화활성을 나타내었다. 이중 항산화활성이 가장 높게 나타난 acetone : methanol의 비가 8 : 2인 획분에 항산화활성이 강한 물질이 존재하는 것으로 생각되어 HPLC에 의하여 항산화성분의 분리를 시도하였다.

HPLC에 의한 항산화성분의 분리 및 확인

Column chromatography에 의해 분리된 각 획분중 항산화활성이 가장 높게 나타난 acetone : methanol의

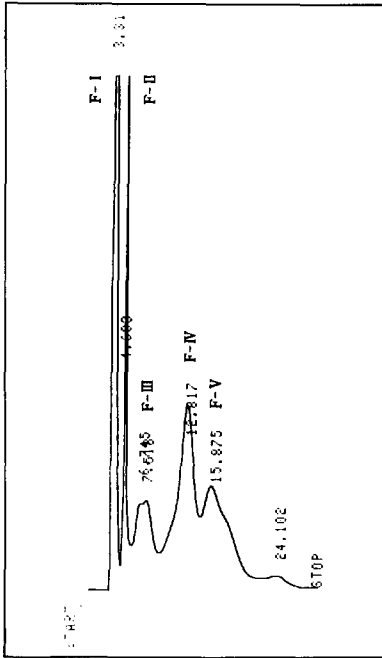


Fig. 3. HPLC chromatogram of the antioxidative components in free phenolic acids from defatted *Perillae semen* flour.

Table 4. Electron donating ability (EDA) of the antioxidative components separated by HPLC

Fractions	Electron donating ability (%)	
	10 μ g	
F-I	22.1	
F-II	2.9	
F-III	6.0	
F-IV	6.3	
F-V	6.7	

비가 8:2인 획분을 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 HPLC로 분리한 chromatogram은 Fig. 3과 같았으며, HPLC에 의해 분리된 각 획분을 분취, 농축한 후 10 μ g씩 첨가하여 전자공여능을 측정된 결과는 Table 4와 같았다.

HPLC chromatogram상에서 F-I, F-II, F-III, F-IV 및 F-V의 활성물질 획분이 분리되었으며, 이들 획분을 각각 분취하여 항산화활성을 비교하였을 경우 F-I 획분의 전자공여능이 22.1%로 가장 높은 항산화활성을 나타내었다. 또한, 항산화활성이 가장 높게 나타난 F-I 획분의 농도를 30 μ g, 100 μ g으로 증가시켜 항산화활성을 측정하였을 경우 Table 5에서 보는 바와 같이 항산화활성이 증가하는 것으로 보아 F-I 획분에 항산화활성을 나타내는 주된 성분이 존재하는 것으로 추

Table 5. Electron donating ability (EDA) of the F-I fraction separated by HPLC

Fraction	Electron donating ability (%)	
	30 μ g	100 μ g
F-I	61.4	90.6

정된다. 현재 F-I 획분에 존재하는 항산화성분에 대한 좀 더 상세한 성분분석 연구가 진행중에 있다.

요 약

자소자의 탈지시료로부터 FPA, SPA 및 IPA 형태의 phenolic 성 물질을 추출하여 이중 항산화활성이 가장 강한 FPA 추출물에 존재하는 항산화성분을 column chromatography 및 HPLC에 의하여 분리하였다. Chlorogenic acid를 표준물질로하여 측정된 탈지된 자소자에 함유되어 있는 phenolic 성 물질의 총합량은 0.38% 였고, 총 phenolic 성 물질중 FPA, SPA 및 IPA 추출물이 차지하는 비율은 71.1%, 15.8% 및 13.1%였다. 세가지 형태의 phenolic 성 물질의 항산화활성을 electron donating ability (EDA)와 linoleic acid를 기질로하여 TBA값을 측정하여 비교하였을 경우 FPA 추출물이 가장 높은 항산화활성을 나타내었다. 항산화활성이 가장 높게 나타난 FPA 추출물을 silica gel column chromatography로 분획하여 항산화활성을 비교한 결과 acetone: methanol의 비가 8:2인 획분에서 가장 높은 항산화활성을 나타내었다. 항산화활성이 가장 높았던 획분을 HPLC에 의하여 분리한 결과 HPLC chromatogram 상에서 5가지 활성물질 획분이 분리되었으며, 이들 획분을 분취하여 항산화활성을 비교한 결과 F-I 획분이 가장 높은 항산화활성을 나타내었다.

문 헌

- Barnes, A.L.: Toxicological and biochemistry of BHA, BHT. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **52**, 59 (1975)
- Omaye, S.T., Reddy, K.A., Cross, C.E.: Effect of butylated hydroxytoluene and other antioxidants on mouse lung metabolism. *J. Toxicol. Environ. Health*, **3**, 829 (1977)
- Farag, R.S., Ali, M.N. and Taha, S.H.: Use of some essential oils as natural preservatives for butter. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **67**, 188 (1990)
- Cort, W.M.: Antioxidant activity of tocopherols and ascorbyl palmitate and ascorbic acid and their mode of action. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **51**, 321 (1984)
- Farag, R.S., Badei, A.Z.M.A., Hewedi, F.M. and El-

- Baroty, G.S.A.: Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **66**, 792 (1989)
6. 지청일, 변한석, 강진훈, 이태기, 김선봉, 박영호 : 식용 대두유에 대한 항산화추출물의 항산화작용. 한국영양식량학회지, **21**, 551 (1992)
 7. Hirose, T., Kawai, H. and Hosogai, Y.: Antioxidative substances in *Glycyrrhizae Radix*. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **29**, 418 (1982)
 8. 김현구, 김영언, 도정룡, 이영철, 이부용 : 국내산 생약추출물의 항산화효과 및 생리활성. 한국식품과학회지, **27**, 80 (1995)
 9. Larson, R.A.: The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, **27**, 969 (1988)
 10. Kasuga, A., Aoyagi, Y. and Sugahara, T.: Antioxidant activities of edible plants. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **35**, 828 (1988)
 11. Rhee, K.S. and Ziprin, Y.A.: Oilseed protein ingredients as antioxidant for meat in food service. *J. Food Prot.*, **44**, 254 (1981)
 12. Hayase, F. and Kato, H.: Antioxidative components of sweet potatoes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **30**, 37 (1984)
 13. 이기영 : 탈지들깨박에서 분리한 페놀화합물의 항산화효과. 한국식품과학회지, **25**, 9 (1993)
 14. 신민교 : 原色 臨床本草學. 남산당, 서울, p.519. 566 (1986)
 15. 김재길 : 천연약물대사전. 남산당, 서울, 상권 p.172 (1984)
 16. 채영복, 김완주, 지옥표, 안미자, 노영주 : 한국유용식물 자원연구총람, 화학 (1988)
 17. Kameoka, H. and Nishikawa, K.: The composition of the essential oil from *Perilla frutescens* L. Brit. var. *acuta* Thunb. Kudo and *Perilla frutescens* L. Brit. var. *acuta* Thunb. Kudo f. *discolor* Makino. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **50**, 345 (1976)
 18. Ito, H.: Studies on *Folium perillae*. VI. Constituent of essential oils and evaluation of *Genus Perilla*. *Yakugaku Zasshi*, **90**, 883 (1970)
 19. 장희진, 박준영, 김용태 : 자소엽의 휘발성 성분. 한국식품과학회지, **23**, 129 (1991)
 20. 박호식, 김정기, 조무제 : 紫蘇의 産地別 化學組成, 第一報. 脂質의 特性 및 脂肪酸組成. 한국농화학회지, **24**, 224 (1981)
 21. 박호식, 김정기, 조무제 : 紫蘇의 産地別 化學組成, 第二報. Sterol의 組成. 한국농화학회지, **25**, 14 (1982)
 22. Krygier, K., Sosulski, F. and Hogge, L.: Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 330 (1982)
 23. Rhee, K.S., Ziprin, Y.A. and Rhee, K.C.: Antioxidant activity of methanolic extracts of various oilseed protein ingredients. *J. Food Sci.*, **46**, 75 (1981)
 24. Blois, M.S.: Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **181**, 1199 (1958)
 25. Mitsuda, H., Yasumoto, K. and Iwami, K.: Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to Shokuryo*, **19**, 210 (1966)
 26. Sidwell, C.G., Salwin, H., Benca, M. and Mitchell Jr, J. H.: The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **31**, 603 (1954)
 27. 이정희, 이서래 : 국내산 식물성 식품중 페놀성 물질의 함량분석. 한국식품과학회지, **26**, 310 (1994)
 28. Kurechi, T., Kikugawa, K. and Kato, T.: Studies on the antioxidants. VIII. Hydrogen donating capability of antioxidants to 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 2089 (1980)
 29. Paker, L. and Glazer, A.N.: Oxygen radicals in biological systems. In *Methods in Enzymology, Oxygen Radicals in Biological systems*, Academic Press, London, Vol. 186, p.343 (1990)

(1996년 11월 7일 접수)