

대두, 메주 및 된장의 항산화 효과와 아질산염 소거 효과

최계선 · 임선영* · 최재수**†

부산지방식품의약품안전청 시험분석실

*부산대학교 식품영양학과

**부경대학교 식품생명과학과

Antioxidant and Nitrite Scavenging Effect of Soybean, Meju and Doenjang

Gye-Sun Choe, Sun-Young Lim*, and Jae-Sue Choi**†

Test and Analytical Laboratory, Pusan Regional Food and Drug Administration, Pusan 608-080, Korea

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

***Dept. of Food and Life Science, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea*

Abstract

The radical scavenging activity of the methanol extracts was in the order of doenjang > meju > soybean. The methanol extracts were further fractionated with dichloromethane, ethyl acetate, butanol and water in sequence. Among the solvent fractions of the methanol extracts, the ethyl acetate fraction demonstrated high levels of radical scavenging activity. On the other hands, the nitrite scavenging activity of the methanol extracts was in the order of doenjang > soybean > meju. All fractions from doenjang were exhibited the strong nitrite scavenging effect. Especially, H₂O, EtOAc and BuOH fractions with 6mg/10ml concentration exhibited much stronger nitrite scavenging effect than that of L-ascorbic acid. The ethyl acetate fraction showed remarkable antioxidant and nitrite scavenging effects compared with the other fractions obtained from soybean, meju and doenjang. The ethyl acetate fraction of doenjang was further purified by repeated chromatographic methods and isolated three compounds. There are identified as genistin, daidzein and genistein on the basis of spectral data.

Key words : Antioxidant, Radical Scavenging, Nitrite Scavenging, Genistin, Daidzein, Genistein

서 론

한국인의 식생활에 빠질 수 없는 대표적인 발효식품인 된장의 여러 가지 기능성에 대한 과학적인 연구가 행해지고 있고, 근자에는 된장의 항암효과에 관심이 고조되어지고

있다¹⁾.

근래에는 신체의 노화나 성인병과 관련한 각종 질환이 생체내에서 생성된 유리 래디칼이 생체내 고분자 화합물을 변화시켜 관여한다고 보고되고 있다^{2,3)}. 이에 반해 항산화제는 세포막에서 다가 불포화 지방산을 공격하여 지질과

† Corresponding author

산화물 일으키는 oxygen radical이나 hydroxy radical을 소거하게 된다⁴⁾.

또한 식품중의 2급 및 3급 아민류와 반응하여 식품자체 내에서 혹은 위내의 산성 조건하에서 강력한 발암성, 변이 원성의 nitrosamine을 생성하는 전구체로 알려진 아질산염을 파괴하여 N-nitrosamine 생성을 방해하므로 이들로 인한 위암 발생을 감소시킬 수 있음이 여러 연구를 통해 보고되어진 바 있다⁵⁾.

된장은 주원료인 콩으로부터 유래되어질 수 있는 물질과 여러 미생물들에 의한 발효과정에서부터 생성되는 물질을 고려해 볼 때, 여러 가능성을 가진 우수한 발효식품이라고 추측되어진다.

그러므로 본 연구는 재래식 된장이 콩으로부터 제조되기에 콩 및 콩 발효 식품인 메주, 된장의 발효과정을 거치는 동안 항산화력과 아질산염 소거 효과의 변화 추이를 관찰하고자 한다. 또한 항산화력과 아질산염 소거 효과를 나타내는 분획을 분리, 정제하여 활성 물질을 밝히고자 한다.

항산화력의 검색방법으로 본 연구에서는 실제적인 지방의 β-산화와 같은 산화과정의 저해가 아닌, 정량적인 방법으로 안정한 free radical인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 사용하여 그 소거능을 측정하였으며^{6,7)}, 아질산염 소거능의 측정은 'Standard Methods Committee'에서 공인된 방법⁸⁾에 의거하였다.

재료 및 방법

시료

콩, 메주 및 된장은 화영식품(주)으로부터 공급받아서 사용하였으며, 콩은 건조상태에서 분말화하였고 메주, 된장은 동결 건조한 다음 분말화하여 hexane으로 3회 추출하고, 잔사물은 2배의 메탄올로 95°C에서 3회 추출하였다. 회전식 진공 농축기를 이용하여 농축한 후, 다시 디클로메탄, 에칠아세테이트 및 부탄올, 물 가용부로 용매 분획하였다.

시약

추출 및 column chromatography용 용매는 시약용 1급을 사용하였고, TLC plate는 Merk의 Kieselgel 60을, Sephadex LH-20, DPPH, L-ascorbic acid는 Sigma사 제품을 사용하였다. NaNO₂는 Wako회사 제품을, sulfanilamide와

N-(1-naphtyl)-ethylenediamine-2HCl은 Junsei와 Koch-Light Ltd. 것으로 사용하였다.

DPPH 래디칼 소거작용

유리래디칼 소거 작용의 실험은 각 시료의 DPPH radical에 대한 소거효과를 측정하였다. 시료의 각 분획을 2mg을 취해 MeOH 25ml로 정용한 후 각각의 농도를 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25µg/ml로 희석하여 시료용액 4ml와 1.5 × 10⁻⁴ M농도로 메탄올에 용해시킨 DPPH용액 1ml씩을 잘 혼합하여 실온에서 30분 방치 후, 520nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 유리래디칼 소거 활성을 백분율로 나타내었으며, 3회 반복실험하여 얻은 결과를 평균한 값으로 나타내었다.

아질산염 소거작용

아질산염 소거능은 1mM NaNO₂용액에 1ml에 소정 농도의 시료를 첨가하고, 여기에 0.1N HCl로 pH를 1.2로 조정하여 반응액의 부피를 10ml로 하였다. 이렇게 한 다음, 37°C에서 1시간 반응시켜서 얻은 반응액을 각각 1ml씩 취하고, 여기에 2% 초산용액 5ml를 첨가한 다음, Griess시약 (30% 초산으로 각각 조제한 1% sulfanilic acid와 1% naphtylamine을 1 : 1비로 혼합한 것으로, 사용 직전 조제) 0.4ml를 가하여 잘 혼합시킨 후 실온에서 15분간 방치시킨 후, 분광 광도계를 사용하여 520nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염의 양을 구하였다. 공시험은 Griess시약 대신 증류수를 0.4ml 가하여 상기와 같은 방법으로 행하였다.

아질산염 소거작용은 시료를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 아질산염 백분율로써 나타내었으며, 이 값이 큰 것일수록 아질산염 소거작용이 크다는 것을 의미한다.

된장의 에칠아세테이트 분획의 화합물 분리

된장의 메탄올 추출물로부터 얻은 에칠아세테이트 분획을 Sephadex LH-20과 silica gel column chromatography를 반복하여 활성 성분을 분리하였으며, 각 용매 분획물과 column chromatography에서 얻은 화합물의 정성은 TLC로 행하였고, ¹H-NMR, ¹³C-NMR spectrophotometer로 화합물의 구조를 동정하였다.

결론 및 고찰

대두, 메주 및 된장의 항산화 효과 항산화작용의 검색은 메탄올 추출물과 그 분획물들에 대한 DPPH radical 소거 효과는 Table 1, 2, 3과 같았다. 식물로부터 항산화 물질 추출 시험에서 가장 많이 사용되고 있는 용매는 메탄올인데 이는 비교적 항산화 효과가 높은 극성물질의 추출과 함께 수율이 높기 때문이다. 탈지 대두박을 이용한 김 등⁹⁾의 연구에 의하면 여러 가지 용매에 의한 추출물 중에서 항산화 성분의 추출에 좋은 용매는 메탄올이었다.

Table 1의 대두의 각 분획에 대한 래디칼 소거 효과는 BuOH과 H₂O분획은 거의 효과를 나타내지 않았으며, EtOAc와 CH₂Cl₂ 분획에서 다른 분획들에 비해서 비교적 소거율이 높게 나타났다. 이는 Ebata 등¹⁰⁾의 연구보고에서 콩의 에칠아세테이트층의 isoflavone의 함량이 높았던 것과 같이, 다른 분획보다 EtOAc분획에 활성물질이 많고, CH₂Cl₂ 분획의 불포화지방산에서 유래된 것으로 여겨진다.

Table 2의 메주의 래디칼 소거율은 모든 분획에서 비슷한 효과를 나타냈다. 그 중 EtOAc와 CH₂Cl₂ 분획에서 다른 분획보다 약간 높았으며, 그외의 분획에서는 대두보다 효과가 컸으며, 대두에서는 효과가 거의 없었던 BuOH과 H₂O 분획에서도 대두보다 효과가 높게 나타났다.

Table 3의 된장의 래디칼 소거 효과는 EtOAc > BuOH > MeOH > CH₂Cl₂, H₂O 분획 순으로 나타났으며, EtOAc 분획의 320μg/4ml의 농도에서는 72.6%의 radical 소거 효과를 보였다.

대두, 메주, 된장의 발효과정을 거치는 동안 MeOH ext.의 래디칼 소거 효과는 320μg/4ml의 농도에서 14.4%, 15%, 40.5%로 증가되었고, BuOH 분획에서도 각각 9.1%, 11.3%, 48.9%로 증가 하였다. 그러나 CH₂Cl₂ 분획의 소거 효과는 발효과정을 거치는 동안 30.7%, 22.5%, 7.8% (320μg/4ml)로 오히려 감소하는 경향을 보였다. 전체적인 항산화 효과는 된장 > 메주 > 대두 순으로 나타났으나, 메주와 대두의 경우 큰 차이는 나타나지 않았다.

EtOAc의 분획에서는 대두, 메주 및 된장 모두에서 래디칼 소거효과가 대체로 높게 나타났다. 특히 된장의 경우 L-ascorbic acid의 수준에는 미치지 못하는 못하나 비교적 좋은 radical scavenger임을 알 수 있었다. 이는 된장이 여러 종류의 미생물에 의해 발효과정을 거치는 동안 원재료인 콩에

서는 없었던 혹은 함량이 적은 성분들이 생성되거나 증가되어 활성을 나타내는 것으로 추정되어진다.

또한 Santiago 등¹¹⁾은 miso의 경우도 DPPH, hydroxyl superoxide, hydrogen centered radical과 carbon-centered radical과 같은 유리 래디칼의 소거 작용 뿐만 아니라 흰쥐의 대뇌피질에서 지질의 과산화손상을 방지하는 것으로 보고 한 바 있으며, 이는 miso의 주성분인 콩속에 함유된 토코페롤, 이소플라본, 사포닌과 같이 알려진 항산화 물질의 효과일 것이라고 추정된 바 있다.

대두, 메주 및 된장의 아질산염 소거 효과

Table 4의 대두 MeOH ext.의 각 분획에 대한 아질산염 소거율은 EtOAc > CH₂Cl₂ > BuOH > H₂O > MeOH 분획의 순으로 나타났으며, 항산화 효과가 컸던 EtOAc와 CH₂Cl₂ 분획에서 82.7%, 70.1% (10mg/10ml의 농도)의 아질산염 소거 효과를 나타내었다. 그외의 분획에서는 BuOH과 H₂O분획이 MeOH ext.보다 낮은 항산화 효과를 보였는데, 아질산염 소거 효과는 47.3%와 41.5%로 29.3% 보다 높게 나타났다. 메주의 각 분획은 거의 효과가 나타나지 않았다.

Table 5의 된장의 아질산염 소거 효과는 된장의 모든 분획에서 높은 효과를 나타냈으며, 6mg/10ml의 농도에서는 100% 저해효과를 보였다. EtOAc분획과 BuOH분획은 6mg/10ml의 농도에서 95.6%, 89.9%의 소거 효과를 보여, 동일 농도에서의 L-ascorbic acid의 87.2% 효과를 상회하는 것으로 된장의 강한 아질산염 소거 효과를 확인할 수 있었다.

또한 항산화 효과가 낮았던 CH₂Cl₂와 H₂O분획에서도 강한 아질산염 소거 효과를 보였다.

대두의 경우 EtOAc분획에서 소거 효과가 컸으며, 된장의 경우는 H₂O, EtOAc, BuOH, CH₂Cl₂ 분획등 모든 분획에서 비교적 높은 효과를 나타냈는데, 이는 아질산염 소거 활성은 메탄올 추출물과 그 분획물에 두루 퍼져 있어 활성물질은 여러 성분으로 추정되어진다.

된장의 경우, BuOH과 EtOAc, H₂O분획의 6mg/10ml 농도 이상에서 L-ascorbic acid의 효과를 상회하는 활성을 보였다.

메주의 경우는 거의 효과를 기대할 수 없었으며, 전체적으로 대두보다 된장에서 아질산염의 소거 효과가 크게 나

Table 1. Radical scavenging effect of methanol extrat and its fractions of soybean on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl-(DPPH) radical

Fractions		Conc(µg/4ml)						
		5	10	20	40	80	160	320
MeOH	ext.	-	2.1	2.4	8.1	12.4	13.4	14.4
CH ₂ Cl ₂	fr.	7.6	8.9	10.6	13.1	15.6	15.8	30.7
EtOAc	fr.	-	-	-	7.8	10.7	23.4	43.9
BuOH	fr.	-	-	-	0.9	1.8	2.6	9.1
H ₂ O	fr.	-	-	-	-	-	-	1.7
L-Ascorbic acid		75.6	84.7	85.2	92.1	93.5	94.6	96.8

Percentage of reduction on DPPH radical after 30 min Values are means of three times.

Table 2. Radical scavenging effect of methanol extrat and its fractions of meju on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl-(DPPH) radical

Fractions		Conc(µg/4ml)							
		5	10	20	40	80	160	320	480
MeOH	ext.	-	-	-	-	-	-	1.50	15.0
CH ₂ Cl ₂	fr.	5.0	6.3	7.5	7.5	11.3	16.3	22.5	30.0
EtOAc	fr.	2.5	2.5	7.5	8.7	15.0	22.5	33.8	42.5
BuOH	fr.	0.0	0.0	5.0	6.3	10.0	10.0	11.3	20.0
H ₂ O	fr.	5.0	7.5	7.5	8.7	10.0	10.0	12.5	15.0
L-Ascorbic acid		60.0	96.3	97.8	-	-	-	-	-

Percentage of reduction on DPPH radical after 30 min Values are means of three times.

Table 3. Radical scavenging effect of methanol extrat and its fractions of doenjang on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl-(DPPH) radical

Fractions		Conc(µg/4ml)						
		5	10	20	40	80	160	320
MeOH	ext.	4.1	7.3	7.8	9.6	16.3	22.7	40.5
CH ₂ Cl ₂	fr.	2.2	4.7	5.8	6.1	6.7	7.3	7.8
EtOAc	fr.	4.6	6.6	15.0	16.5	28.8	43.5	72.6
BuOH	fr.	1.1	2.5	5.3	10.2	12.0	27.6	48.9
H ₂ O	fr.	2.2	3.6	5.1	6.7	7.0	7.6	8.1
L-Ascorbic acid		75.6	84.7	85.2	92.1	93.5	94.6	96.8

Percentage of reduction on DPPH radical after 30 min Values are means of three times.

타났다.

Kurechi 등⁵⁾은 콩제품인 tofu, soya milk, miso, bonclat 등이 위내의 pH 3에서 nitrite와 dimethylamine에 의해 생성되는 nitrosamine의 생성을 크게 저해하였으며, pre-ca-

rcinogen인 nitrite도 직접 파괴 하였는데 이에 관여한 물질을 불포화지방산과 페놀계 화합물이라고 주장한 바 있다. 된장이 원재료인 콩보다 항산화 및 아질산염 소거 효과가 더 뛰어난 것은 콩으로부터 유래된 물질 뿐만 아니라 여

Table 4. Nitrite scavenging effect of the methanol extract and its fractions of soybean

Fractions	Conc($\mu\text{g}/4\text{ml}$)					
		2	4	6	7	10
MeOH	ext.	23.8	24.9	25.5	27.8	29.3
CH ₂ Cl ₂	fr.	-	12.5	23.1	56.5	70.1
EtOAc	fr.	32.2	63.3	67.4	77.6	82.7
BuOH	fr.	15.7	20.6	34.4	39.5	47.3
H ₂ O	fr.	-	3.2	32.4	39.9	41.5
L-Ascorbic acid		73.8	85.8	87.	90.3	96.8

Nitrite was incubated at pH 1.2 and 37°C for 1hr Value are means of three experiments.

Table 5. Nitrite scavenging effect of the methanol extract and its fractions of doenjang

Fractions	Conc($\mu\text{g}/4\text{ml}$)					
		2	4	6	7	10
MeOH	ext.	49.4	63.5	74.5	77.1	82.5
CH ₂ Cl ₂	fr.	28.6	31.6	71.4	97.4	100.0
EtOAc	fr.	45.6	69.1	95.6	97.4	100.0
BuOH	fr.	50.3	66.0	89.9	98.1	100.0
H ₂ O	fr.	57.9	75.6	100.0	100.0	100.0
L-Ascorbic acid		73.8	85.8	87.2	90.3	96.8

Nitrite was incubated at pH 1.2 and 37°C for 1hr Value are means of three experiments.

기에 콩에 고분자 영양물질이 여러 미생물에 의한 발효분해 과정을 거쳐 새로운 저분자 물질이 첨가되어져 나타난 효과라고 사료되어진다.

요 약

본 연구에서는 된장의 기능성 중에서 대두, 메주, 된장의 발효과정을 거치는 동안 항산화 효과와 아질산염 소거 효과의 변화 추이를 고찰하기 위해 DPPH radical 소거능과 아질산염 소거능을 통한 된장의 활성을 시험하였다. 대두, 메주 및 된장은 methanol extract를 계통 추출법에 의거하여 여러 가지 용매를 사용하여 분획하였으며, 각 분획에 대한 활성실험을 행하였다. MeOH ext.로 본 항산화 효과는 된장 >메주 >대두의 순으로 나타났고, 메주와 대두 간의 효과의 차는 거의 없었다. 아질산염 소거효과는 된장 >대두 >메주의 순을 보였고, 래디칼 소거능보다 아질산염 소거능이 더 효과적으로 나타났다.

Ethyl acetate 분획에 있어 항산화 효과가 컸으며, 특히 아질산염의 소거 효과는 L-ascorbic acid의 효과를 상회하였다.

이에 된장의 ethyl acetate 분획을 반복 정제하여 genistin, daidzein, genistein을 분리하였으며, 이는 된장의 항산화 및 아질산염 소거 효과를 나타내는 활성 물질들은 대두 중의 페놀성물질에서 크게 벗어나지 않음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. 임선영 : 된장의 항돌연변이 및 항암효과. 부산 대학교 대학원 박사학위논문 (1997).
2. Ames, B. N. : Endogenous oxidative damage, aging and cancer, *Free Rad. Res. Comms.*, 7, 121(1989).
3. Cutler, R. G. : Antioxidants, aging and longevity. In "Free radicals in biology" 1, Pryor, W. A. (ed.), Academic press, Orlando, 6, 11(1984).
4. Aust, S. D. and Sringer, B. A. : The role of ion in

- enzymatic lipid peroxidation. "Free radicals in biology", Pryor, W. A. (ed.), Academic press, Orlando, 5, 1(1982).
5. Kurechi, T., Kikugawa, K., Fukuda, S. and Hasunuma, M. : Inhibition of N-nitrosamine formation by soya products. *Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 425(1981).
 6. Blois, M. S. : Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 26, 1199(1958).
 7. Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Uehara, I., Komagoe, K., Fujita, Y. and Okuda, T. : Studies on inhibition mechanism of antioxidation by tannins and flavonoids. V. Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl radical. *Chem. Pharm Bull.*, 37, 1919(1989).
 8. APHA, AWWA, WPCA : Standard methods for examination of water and wastewater, 16, 404(1985).
 9. 김지영, 맹영선, 이기영 : 다양한 용매를 이용한 대두 추출물의 항산화 효과. *한국식품과학회지*, 27, 635 (1995).
 10. Ebata, J., Fukuda, Y., Hirai, K. and Murata, K. : β -glucosidases involved in the antioxidant formation in tempeh, fermented soybeans. *Japanese Agri. Chem.*, 46, 323(1972).
 11. Santiago, L. A., Hiramatsu, M. and Mori, A. : Japanese soybean paste miso scavenges free radicals and inhibits lipid peroxidation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 38, 297(1992).