

분말청국장에서 알코올로 추출한 물질의 항산화능

이재중 · 조창훈 · 김지연¹ · 이동석² · 김한복*

호서대학교 자연과학부 생명과학전공, ¹인제대학교 바이오헬스소재 연구센터,
²인제대학교 의생명공학대학 임상병리학과

Bacillus licheniformis B1을 이용하여 청국장발효를 거쳐 보존성이 높은 분말청국장을 제조하였다. 분말청국장의 다양한 생리활성 물질 중에서도 항산화물질의 존재여부와 그 효과를 결정하였다. 분말청국장을 증류수로 추출하여, Sephadex G-75 gel filtration chromatography 작업을 수행한 후, 390 nm에서 광범위한 분자량의 갈변물질을 검출할 수 있었다. 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 이용하여 갈변물질의 항산화도를 결정하였다. 분자량이 큰 갈변물질의 항산화도는 매우 약하였으나, 분자량이 작은 갈변물질에서는 10-20%의 항산화능이 결정되었다. 체내에서는 분자량이 작은 갈변물질의 흡수가 더 유리할 수 있다. 분말청국장의 항산화물질 추출에 ethanol을 이용했을 때는 60.1%, methanol을 이용했을 때는 58.9%의 높은 항산화능을 보여주어, 증류수로 추출했을 때에 비해 훨씬 효율적이었다. 또한 분말청국장을 ethanol에 5%이상 되게끔 녹였을 때 항산화도가 가장 컸다. 본 분말청국장에 존재하는 항산화물질은 항산화능이 우수하였는데, 앞으로 안정성이 확보된다면, 식용류, 주류에 첨가하는 천연 항산화물질로 개발할 수 있을 것이다.

Key words □ antioxidant activity, *Bacillus licheniformis*, browning material, Chungkookjang powder, DPPH, ethanol, melanoidin, methanol

오늘날 잘못된 음식물의 섭취가 성인병과 관련이 있다는 시각이 보편화되고 있다. 식품의 단순한 영양학적 기능을 떠나, 좀더 적극적으로 질병을 예방하고 치료하고자 하는 시도가 많이 이루어지고 있다.

대두는 미국 국립암연구소에서도 대표적인 암예방 식품으로 인정하고 있다. 대두 발효식품인 청국장에는, 대두가 갖고 있는 원래의 유익한 물질과 더불어, 단백질 분해효소(20), 고분자핵산(5), 갈변물질(5,6), 점질성 polyglutamic acid(5,12)등이 새로이만 들어진다. 청국장의 단백질 분해산물인 아미노산 조각들의 혈압강하 효과가 알려져 있다(14). 또한 polyglutamic acid는 rat의 소장에서 칼슘이나(19) 항암제 탁솔의 흡수를 증진시키는 효과가 있다는 보고가 있다(17). 또한 청국장에도 존재하는 trypsin inhibitor는 항암효과가 있다(13).

다른 일반적인 장류식품과 달리, 청국장은 소금을 사용하지 않고 제조할 수 있다. 이러한 점에서 청국장의 섭취는 한국인의 소금의 과다섭취를 막아준다. 청국장은 3-4일간의 비교적 단기간에 제조할 수 있는 장점이 있는 반면, 실온에서 오래 보존하기가 힘들다. 청국장을 분말화시키면 보존성이 높아진다. 그러나 분말청국장에도 습식 청국장에서처럼 생리활성물질의 활성이 유지되는지 여부를 확인할 필요가 있다. 이 연구에서는, 우선 많은 생리활성 물질 중에서도 분말청국장의 항산화물질 존재 여부와 그

효과를 결정하였다. 항산화물질은 과일과 채소에 많이 존재하며 많은 경우에 항암효과와 관련되어 있다(1,21,22). 대두와 청국장에 존재하는 대표적인 항산화물질에는 chlorogenic acid, isochlorogenic acid, caffeic acid, isoflavone, genistein, 대부분의 아미노산 및 갈변물질 등이 알려져 있다 (2-7,11,15,16,18).

이 연구에서는 *Bacillus licheniformis* B1을 이용하여 분말청국장을 제조하였으며, 증류수에 의해 추출된 갈변물질과, 유기용매에 의해 추출된 물질의 항산화효과를 결정하였다.

재료 및 방법

청국장 발효균주

청국장 제조에 필요한 균주는 *Bacillus licheniformis* B1을 이용하였다(5).

분말청국장의 제조

청국장 발효(5)를 하여 습식청국장을 만든 후 진공 동결 건조기를 이용하여 건조하였다. 건조한 시료를 분쇄하여 미세한 분말을 제조하였다.

크로마토그래피 작업

분말청국장 6 g에 증류수 60 ml를 가하여 진탕하였다. 그런 후 12,000×g 4°C에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 크로마토그래피를 수행하였다. Sephadex G-75 bead를 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에서 100°C에서 3시간 동안

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 041-540-5624, Fax: 041-548-6231
E-mail: hbkim@office.hoseo.ac.kr

swelling한 후 column (2.5×50 cm)에 충전하였다. 분말청국장에서 추출한 상층액 2.5 ml을 column에 loading하였고 flow rate는 0.5 ml/min으로 했으며, fraction당 3 ml을 취하였다. 각 분획물을 390 nm에서 흡광도를 측정하여 갈변물질을 확인하였다.

갈변물질의 흡수스펙트럼 결정

위와 같이 Sephadex G-75 gel filtration chromatography를 수행하여 갈변물질을 분리하였다. Spectrophotometer(UVICON 930)를 이용하여 200-500 nm에 걸쳐서 각 fraction에 포함되어 있는 갈변물질의 흡수스펙트럼을 결정하였다.

항산화도 결정

항산화능은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 방법을 이용하였다(8). DPPH는 ethanol에 녹여 0.2 mM 농도의 것을 사용하였다. 각 sample 750 μ l에 DPPH 용액 750 μ l를 10초간 충분히 섞어주고 30분간 반응시킨 후, 517 nm에서 흡광도 감소를 측정하였다.

유기용매에 의한 항산화물질의 추출

분말청국장의 항산화물질을 추출하기 위해 유기용매인 100% ethanol과 methanol을 사용하였다. 분말청국장을 각 용매에 10% (w/v)가 되게끔 녹인 후, 12000×g, 4°C에서 15분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. DPPH 방법을 이용해, 상층액의 항산화능을 결정하였다. 또한 spectrophotometer의 time drive 기능을 이용하여, 유기용매에 의해 분말청국장으로부터 추출한 물질과 DPPH 용액을 섞어준 후, 초기 항산화능의 변화 양상을 포함하여, 1 시간동안 항산화능의 kinetics를 추적, 결정하였다.

분말청국장의 농도에 따른 항산화능 결정

분말청국장의 농도를 증가시킴에 따라 항산화능이 증가되는지 여부를 결정하기 위해, 100% ethanol에 분말 청국장을 0.5, 1, 5, 10, 15, 20% (w/v)되게끔 녹이고, 30분간 교반하였다. 교반한 후 12000×g, 4°C에서 15분간 원심분리하여 상층액을 얻어서 DPPH 방법을 이용하여 항산화능을 결정하였다.

결과 및 고찰

수용성 갈변물질의 분리

청국장 성분 중 갈변물질은 당과 아미노산 사이에서 생성된 Maillard 반응생성물, melanoidin이다(7). Melanoidin은 강력한 항산화물질로 알려져 있다. 갈변물질 존재여부를 알기 위해서는 일반적으로 390 nm에서 흡광도를 결정한다(5,6). 분말청국장을 증류수에 녹인 후, Sephadex G-75 gel filtration chromatography를 이용하여 분획물을 얻고 390 nm에서 흡광도를 결정하였다(Fig. 1). 측정결과 갈변물질은 17번 분획물로부터 90번까지 광범위하게 존재하였다. 이는 갈변물질의 분자량이 매우 다양함을 시사해 준다. 특히 35번 분획물에 가장 많은 갈변물질이 존재하였다.

수용성 갈변물질의 항산화능

갈변물질의 갈변정도와 항산화능이 비례하는지 여부를 결정하였다. 갈변물질의 농도가 높은 앞쪽 분획에서는 항산화능이 거의 없는 것으로 측정되었다(Fig. 1). 그러나 50번 분획부터는 항산화능이 나타나기 시작하여 마지막 분획까지 평균 10%이상의 항산화능을 나타냈다. 특히 80번 분획에서는 최고의 항산화능 (20%)을 보여 주었는데, 이 분획의 갈변물질은 저분자량에 해당되는 것으로 추정된다. 본 연구를 통해 분말청국장에는 분자량이 큰 갈변물질은 항산화능이 거의 없었으며, 분자량이 작은 갈변물질은 항산화능이 더 강한 것을 확인할 수 있었다. 이를 뒷받침하는 다른 보고도 있다(7). 분자량이 작은 갈변물질은 생체내에서 보다 효율적으로 흡수, 이용될 수 있는 장점이 있을 것으로 사료된다.

각 분획물의 파장에 따른 흡수 스펙트럼

28, 34, 48, 60, 74번 분획물에 대해서 파장별 스펙트럼을 결정하여 보았다. 60번과 74번 분획물에서는 285 nm에서 상당히 높은 peak가 관찰되었으며, 48번에서는 약한 peak, 그리고 28, 34번 분획물에서는 285 nm에서 전혀 peak가 관찰되지 않았다(Fig. 2). 이러한 갈변물질의 흡수 스펙트럼은 이미 보고된 것과 일치하였다(4). 285 nm에서 peak를 보이는 60번, 74번 분획물은 앞서의 갈변물질의 항산화능이 높은 영역에 속한다. 따라서 285 nm에서 peak에 해당하는 갈변물질 성분이 항산화능에 크게 기여할 것으로 추정된다. 285 nm에서 phenol, aromatic amine 등의 흡수가 잘 일어나는 것으로 알려져 있기 때문에(2), 74번의 갈변물질의 당-아미노산 성분에도 phenol류가 많이 포함되어 있으리라 보인다. 갈변물질의 농도가 높은 34번 분획물은 390 nm에서 다른 분획물보다 더 높은 흡광도를 나타냈는데, 이는 크로마토그래피 작업의 결과(Fig. 1)와 일치하였다.

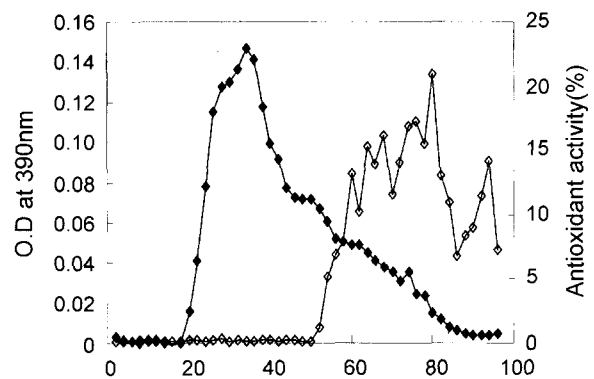


Fig. 1. Gel filtration chromatography and antioxidant activity of *Chungkookjang* powder. Substances extracted by dH₂O from *Chungkookjang* powder were separated, using Sephadex G-75 gel filtration chromatography (◆). Browning material was determined at 390 nm (◇). Antioxidant activity of browning material was determined using DPPH method. The experimental results were obtained after at least three sample analyses.

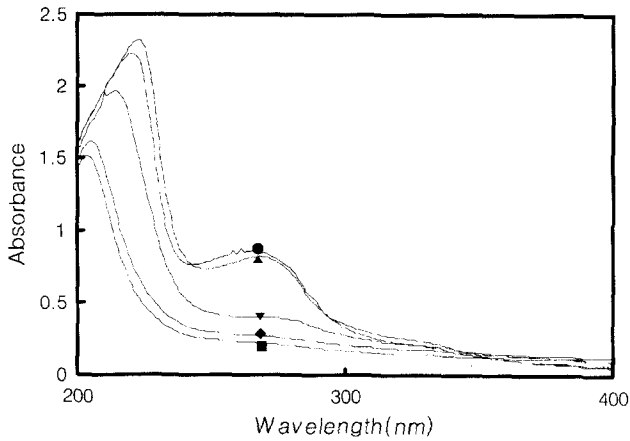


Fig. 2. UV-VIS spectra of browning material from *Chungkookjang* powder. Browning material eluted by Sephadex G-75 gel filtration chromatography (Fig. 1) was scanned by spectrophotometer at the range between 200 and 500 nm. 28(■), 34(◆), 48(▼), 60(●) 74(▲) fractions obtained by gel filtration chromatography.

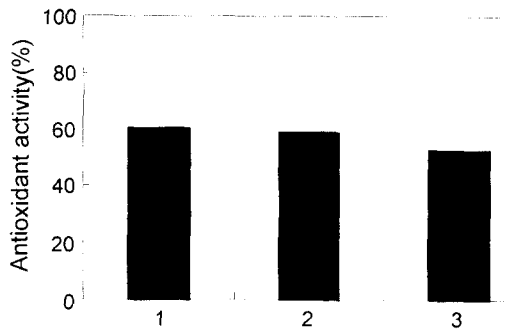


Fig. 3. Antioxidant activity of substances eluted by organic solvents from *Chungkookjang* powder. Substances in the powder were extracted by 100% ethanol (lane 1), 100% methanol (lane 2). Their antioxidant activities were determined using DPPH method. BHA solution (0.05%) was used as a control (lane 3).

유기용매에 의한 분말청국장의 항산화물질 추출

증류수에 녹은 분말청국장의 항산화물질은 항산화능이 10-20%로 그렇게 높은 편이 아니었다. Ethanol이나 methanol과 같은 유기용매가 생리활성 물질 추출에 많이 이용되고 있다(2). 분말청국장을 100% ethanol이나 methanol에 녹여 상층액의 항산화능을 결정했을 때, ethanol에 의한 경우는 60.1%, methanol에 의한 경우는 58.9%의 매우 높은 항산화능을 보여 주었다. 이는 증류수 의해 분말청국장에서 추출된 것에 비해 3배 이상의 값이었다. 강력한 합성 항산화제로 알려진 BHA (butylated hydroxyanisole)의 항산화능은 53.1%이었다(Fig. 3). 따라서 분말청국장에서 항산화물질을 추출하는 데는 증류수보다는 ethanol이나 methanol과 같은 유기용매가 훨씬 효율적인 것으로 사료된다. 유기용매에 의해 추출된 항산화물질에는 genistein, galbenolide 등이 포함되어 있을 것으로 보인다. 보다 정확한 구성성분을 분석하기 위해서는, 앞으로 NMR, ESR, IR 등을 이용한 보다 깊이 있는 구조분석이 이루어져야겠다.

Ethanol과 methanol에 의해 분말청국장에서 추출된 물질의 항산화능을 spectrophotometer의 time drive기능을 이용해 1 시간 동안 추적해 보았을 때, 초반 10분 이내에 급격한 흡광도의 감소를 확인할 수 있었다(Fig. 4). 따라서 두 용매에 의해 추출된 항산화물질은 빠른 속도로 유리기를 제거할 수 있는 능력을 갖고 있을 것으로 추정된다. Methanol이 ethanol보다는 초반 10분까지는 유리기 제거 능력이 뛰어 났으나 1시간이 지났을 때는 두 용매 모두 비슷한 결과를 나타내었다.

분말청국장의 농도에 따른 항산화능 결정

항산화도가 가장 크게 나타나는 농도를 결정하기 위해 분말청국장을 100% ethanol에 0.5에서 20% (w/v)가 되게끔 녹인 후 항산화능을 결정하였다(Fig. 5). 그 결과 5%까지는 항산화도가 증가하였으나 5%이상의 농도에서는 항산화도가 일정하게 유지되었다. 따라서 항산화물질을 얻기 위해, 분말청국장을 ethanol에 녹일 때는 분말청국장을 5%이상 높일 필요는 없다.

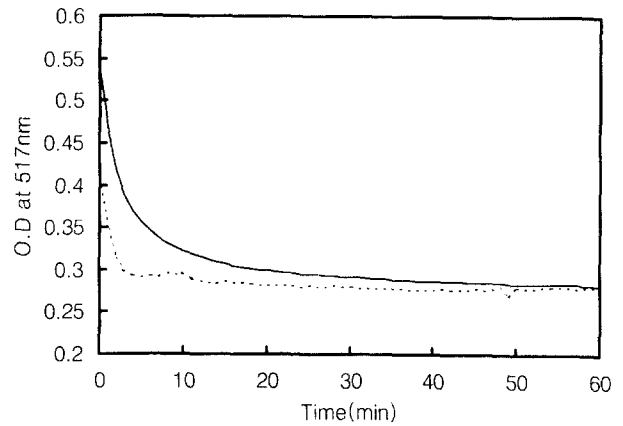


Fig. 4. Rate of antioxidant activity of substances extracted by organic solvents from *Chungkookjang* powder. Time drive function of spectrophotometer was used, for substances extracted by ethanol (—) and methanol (---) which was mixed with DPPH solution.

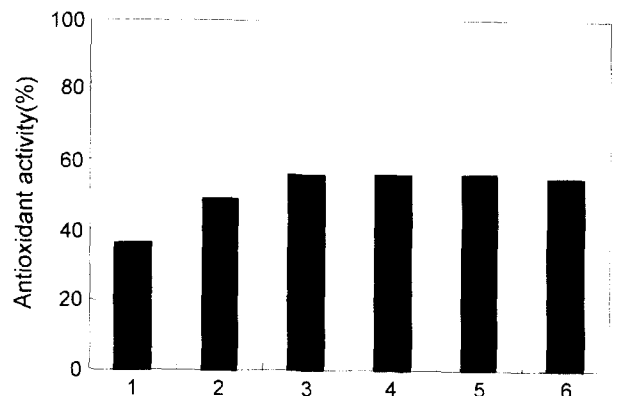


Fig. 5. Determination of optimum amount of *Chungkookjang* powder for efficient antioxidant activity. *Chungkookjang* powder was dissolved in 100% ethanol to be 0.5 (lane 1), 1 (lane 2), 5 (lane 3), 10 (lane 4), 15 (lane 5), and 20%(w/v) (lane 6). Their antioxidant activities were determined using DPPH method.

BHA는 항산화성이 강하지만 안정성에 문제가 있고(9), α -tocopherol은 안전성은 있지만 항산화성이 BHA에 비해 약한 편이다(10). 알코올에 의해 추출된 분말청국장장의 항산화물질은 BHA이상의 항산화성을 갖고 있다. 앞으로 분말청국장장의 항산화물질의 안전성을 검증하는 생체실험이 필요하다. 안정성이 확보된다면, 분말청국장장의 항산화물질은 앞으로 식용유, 주류 등에 천연 항산화제로 광범위하게 개발, 이용될 수 있을 것이다.

감사의 말

본 연구는, 한국과학재단의 인제대 바이오헬스소재 연구센터(RRC) 지원에 의하여 일부 이루어졌기에 감사드립니다.

참고문헌

- 김미혜, 김명철, 박종석, 김종욱, 이종욱. 2001. 다류원료 식물류 물 추출물의 항산화 효과. 한국식품과학회지 33, 12-18.
- 김지영, 맹영선, 이기영. 1995. 다양한 용매를 이용한 대두 추출물의 항산화효과. 한국식품과학회지 27, 635-639.
- 신민자, 안명수. 2000. Caramel 갈색화 반응 생성물의 항산화성에 관한 연구. 한국조리과학회지 16, 629-639.
- 이문조, 김현대, 박진우, 김동수. 1992. Melanoidin과 시판 항산화제의 항산화작용 비교 및 그 상승효과. 한국영양식량학회지 21, 686-692.
- 이재중, 이동석, 김한복. 1999. *Bacillus licheniformis* B1에 의한 청국장 및 간장 발효. 한국미생물학회지 35, 296-301.
- 최웅규, 지원대, 정영건. 1998. *Bacillus subtilis* DC-2로 제조한 청국장장의 특성. 한국식품영양과학회지 27, 846-851.
- 최홍식, 이창용. 1993. Melanoidin의 항산화성 및 항돌연변이원성. 한국영양식량학회지 22, 246-252.
- Abe, N., T. Murata, K. Yamamoto, and A. Hirota. 1999. Bisorbicetonone, a novel oxidized sorbicillin dimer with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity from a fungus. *Tetrahedron Lett.* 40, 5203-5206.
- Branen, A.L. 1975. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 52, 59-63.
- Corl, M.M. 1974. Antioxidant activity of tocopherols and ascorbyl palmitate and their mode of action. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 51, 321-324.
- Hirota, A., S. Taki, S. Kawaii, M. Yano, and N. Abe. 2000. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging compounds from soybean miso and antiproliferative activity of isoflavones from soybean miso toward the cancer cell lines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1038-1040.
- Kambourova, M., M. Tangney, and F.G. Priest. 2001. Regulation of polyglutamic acid synthesis by glutamate in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1004-1007.
- Miyagi, Y., S. Shinjo, R. Nishida, C. Miyagi, K. Takamatsu, T. Yamamoto, and S. Yamamoto. 1997. Trypsin inhibitor activity in commercial soybean products in Japan. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* (Tokyo) 43, 575-580.
- Okamoto, A., H. Hanagata, Y. Kawamura, and F. Yanagida. 1995. Anti-hypertensive substances in fermented soybean natto. *Plant Foods Hum. Nutr.* 47, 39-47.
- Polkowski, K. and A.P. Mazurek. 2000. Biological properties of genistein. A review of *in vitro* and *in vivo* data. *Acta. Pol. Pharm.* 57, 135-155.
- Pratt, D.E. and P.M. Birac. 1979. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. *J. Food Sci.* 44, 1720-1722.
- Singer, J.W., P. De Vries, R. Bhatt, J. Tulinsky, P. Klein, C. Li, L. Milas, R.A. Lewis, and S. Wallace. 2000. Conjugation of camptothecins to poly-(L-glutamic acid). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 922, 136-150.
- Stoner, G.D. and H. Mykhtar. 1995. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J. Cell. Bio. Chem.* 22, 169-180.
- Tanimoto, H., M. Mori, M. Motoki, K. Torii, M. Kadowaki, and T. Noguchi. 2001. Natto mucilage containing poly- γ -glutamic acid increases soluble calcium in the rat small intestine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 516-521.
- Urano, T., H. Ihara, K. Umemura, Y. Suzuki, M. Oike, S. Akita, Y. Tsukamoto, I. Suzuki, and A. Takada. 2001. The profibrinolytic enzyme subtilisin NAT purified from *Bacillus subtilis* cleaves and inactivates plasminogen activator inhibitor type 1. *J. Biol. Chem.* 276, 24690-24696.
- Van der Sluis, A.A., M. Dekker, and W.M.F. Jongen. 1997. Flavonoids as bioactive components in apple products. *Cancer Letters* 114, 107-108.
- Wang, H., G. Cao, and R.L. Prior. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* 44, 701-705.

(Received August 20, 2001/Accepted September 4, 2001)

ABSTRACT : Antioxidant Activity of Substances Extracted by Alcohol from *Chungkookjang* Powder
Jae Jung Lee, Chang Hoon Cho, Ji Yeon Kim¹, Dong Seok Kee², and Han Bok Kim*
(Department of Life Science, Hoseo University, Asan 336-795, Korea , ¹Biohealth Products
Research Center, Inje University, Kimhae 621-749, ²Department of Medical Laboratory Sci-
ence, Inje University, Kimhae 621-749)

It is previously reported that *Bacillus licheniformis* B1 strain isolated from nature was successfully used for *Chungkookjang* fermentation. Antioxidant activity of its powder was determined in this study. Sephadex G-75 gel filtration chromatography was performed, for soluble fractions of the powder extracted by distilled water. The soluble fractions were separated into large and small fractions. The substance 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) was used as an electron acceptor. Antioxidant activity was found in the small fractions. Five% solution of the *Chungkookjang* powder was the most effective in the extraction of antioxidant substances from the powder. It was proven in this study that strong antioxidant activity still remained in the *Chungkookjang* powder.