

Amino-carbonyl 반응에 의한 glucose-poly- γ -glutamate (Glu-PGA) 갈변 반응물질의 항산화적 특성 연구

이남근 · 함영태*
중앙대학교 생명공학과

Antioxidative Characteristics of Browning Reaction Products of Glucose-Poly- γ -Glutamate (Glu-PGA) obtained from Amino-carbonyl Reaction

Nam-Keun Lee and Young-Tae Hahm*
Department of Biotechnology, Chungang University

Effects of poly- γ -glutamate (PGA) on antioxidative characteristics of amino-carbonyl reaction products of glucose were investigated. Rapid browning reaction was observed under heat and alkaline condition (pH 8.2). Browning products were separated by Sephadex G-50, and brown color intensity and electron-donating ability of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) of each fraction were measured. Fraction-7 (F-7) and -20 (F-20) showed high DPPH scavenging values. UV-VIS absorption spectrum of F-20 was similar to melanoidin peak, and F-7 showed maximum absorption peak at 270 nm. Molecular weight of F-7 was over 35 kDa as determined by SDS-PAGE. Although F-20 could not be measured on SDS-PAGE, its size was smaller than F-7.

Key words: poly- γ -glutamate, glucose-poly- γ -glutamate, amino-carbonyl reaction, electron-donating ability, antioxidative

서 론

Poly- γ -glutamic acid(PGA)는 D, L-glutamic acid들이 α -amino와 γ -carboxylic acid 그룹 사이의 amide 결합에 의해 만들어지며, 수용성 고분자 물질로서 음이온성이고 생분해성인 특징을 가지고 있다. 이러한 PGA는 인체에 무해하고 식용 가능한 기능성 물질로 식품, 화장품 및 의학 산업등에 이용될 수 있는 천연자원 신소재로 주목 받고 있다(1).

PGA의 생성은 많은 연구가 보고 되어 있으며(2-6) 이는 *Bacillus* spp.가 대두 발효 식품인 청국장 및 일본의 나토를 생산하는 과정에서 생성되는 대사산물이며, 당이 결합된 실 모양의 끈적끈적한 점질물 형태로 생성되고 균주, 온도 및 영양조건에 따라 차이를 보인다.

청국장 및 청국장 점질물의 갈변 반응에 관한 연구 보고는 미비하나, 대두를 이용한 발효 식품인 간장 및 된장의 갈변은 주로 비효소적인 amino-carbonyl 반응(Maillard 반응)에 기인하고 산소, 온도 및 금속에 의해서 촉진된다고 보고되고 있다

(7-8). 이러한 amino-carbonyl 반응에 의한 갈변은 식품의 품질을 저하시키는 원인이기도 하지만 또한 이 반응에 의해 생성된 갈변 물질은 항산화성을 갖는 것으로 알려져 있다(9-11).

이러한 점으로 볼 때 청국장 점질물인 PGA는 생리활성을 갖는 물질로서 환원당과 비효소적 갈변 반응인 amino-carbonyl 반응에 의해 갈변 반응 물질을 생성함으로써 항산화 효과 등 식품의 기능성을 한층 더 높일 것으로 분석된다.

따라서 본 연구에서는 D, L-glutamic acid 결합체 PGA를 glucose와 결합시켜 amino-carbonyl 반응에 의한 갈변 반응을 유도하였으며, 당-PGA 갈변 반응 물질의 전자 공여성 여부로 항산화력을 측정하여 갈변도와와의 관계를 규명하고, 이들 중 항산화력이 큰 분자량의 범위를 확인하고자 하였다. 이와 같이 PGA의 항산화성을 분석함으로써 우리의 전통 식품인 청국장의 기능성 특성 분석의 기초 자료를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

PGA의 갈변 반응물질 제조

발효된 청국장의 pH에 맞추어(2) Na-free PGA(BioLeaders, Daejeon, Korea)를 0.1 N NaOH로 pH 7.0과 pH 8.2의 1% PGA 용액을 만들었다. Lim의 방법(10)을 변형하여 각 1% PGA 용액에 1% glucose를 첨가한 용액과 첨가하지 않은 용액에 0.2 M NaHCO₃을 가한 후 121°C에서 15분간 처리하여 PGA의 갈변 반응물질을 제조 하였다.

*Corresponding author: Young-Tae Hahm, Department of Biotechnology, Chungang University, 72-1 Nae-Ri, Daedukmyun, Anseong-Si, Gyeonggi-Do 456-756, Korea
Tel: 82-31-670-3064
Fax: 82-31-675-0406
E-mail: ythahm@cau.ac.kr

갈변도 측정

갈변 반응 물질의 갈변도는 UV-VIS spectrophotometer (Beckman, DU® 650, Fullerton, USA)을 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DPPH를 이용한 전자 공여능의 측정

제조된 갈변 반응 물질의 전자 공여능은 Tepe 방법(12)을 일부 변형하여 측정하였다. 각각의 조제된 갈변 반응 물질 200 μ L에 0.004% DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 용액 5 mL을 첨가하여 실온에 방치하면서 10분 간격으로 517 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

PGA 갈변 반응 물질의 분획 및 분획물의 UV-VIS 흡수대 측정

제조된 갈변 반응 물질들의 항산화 효과가 큰 분자량의 범위를 알기 위해서 Lim의 방법(10)에 따라 겔 여과를 하였다. Column chromatography(0.79 $\text{cm}^2 \times 10 \text{ cm}$)에 Sephadex® G-50 (Sigma-Aldrich, Louis, USA)을 충전하고, 0.3 mL PGA 갈변 반응 물질을 전개 시켜 fraction 별로 0.2 mL씩 분획하였다. 이때 전개 용액은 증류수를 사용하였고, 유속은 50 μ L/min이었다. 각 분획된 용액의 갈변도 및 전자 공여능을 측정하였다. 분획된 갈변 반응 물질들의 UV-VIS 흡수대 측정은 UV-VIS spectrophotometer를 이용하였고 scan speed는 1200 nm/min로 하였다.

갈변 반응 물질의 분자량 측정

겔 여과로 분리한 PGA 갈변 반응 물질들의 분자량 측정은 12% SDS-PAGE 겔을 만들어 전기 영동 후 methylene blue로 염색하여 크기를 알아보았다.

결과 및 고찰

PGA 갈변 및 갈변 반응 물질의 DPPH를 이용한 전자 공여능

PGA의 갈변도 및 갈변 반응 물질의 전자 공여능은 Fig. 1과 2에 나타내었다. 중성과 염기성으로 pH가 조절 된, glucose가 첨가되지 않은 D, L-glutamic acid의 결합체인 PGA 용액은 가열에 따라 갈변이 거의 일어나지 않았으며 두 용액 사이의 갈변도는 차이를 보이지 않았다. Glu-PGA 결합체의 갈변은 염기성 조건에서 갈변이 잘 일어난다는 것을 알 수 있었고(Fig. 1), 전자공여에 의해 DPPH의 유리 라디칼이 소거되어 hydrazine 형태로 환원되고 이에 따라 색이 탈색되어 흡광도가 감소되는 원리를 이용한 DPPH의 전자 공여능에 있어서도 염기적 조건 하에서 가장 높게 나타났다(Fig. 2). Glucose를 첨가하지 않은 중성 및 염기성 PGA 용액은 DPPH 용액에서 침전이 되었으나 다소 전자 공여능이 있는 것으로 나타났다. 따라서 PGA 갈변 및 갈변 반응 물질의 DPPH에 의한 전자 공여능은 glucose가 첨가된 염기성 PGA일수록 갈변도가 높으며, 이에 따라 전자 공여능도 크게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

Glu-PGA 갈변 반응 물질의 분획에 따른 갈변도 및 전자 공여능

PGA 갈변 반응 물질의 분획에 따른 갈변도 및 전자 공여능을 알아 보기 위하여 갈변도 및 전자 공여능이 가장 높은 Glu-PGA(pH 8.2) 용액을 선택하여 갈변 반응 물질들을 분획하고 갈변도 및 전자 공여능을 측정하였다.

Fig. 3에서 보듯이 갈변도 및 전자 공여능이 높은 부분은, column 추출 시, 전반부와 후반부에 양극화되어 용출되었으며,

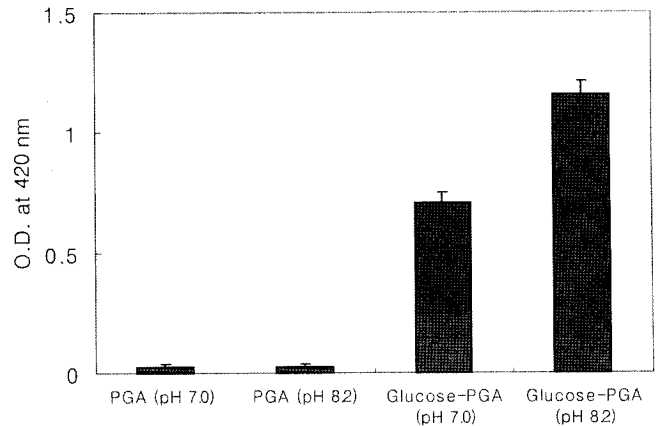


Fig. 1. Browning intensity of PGA by heating for 15 min at 121°C.

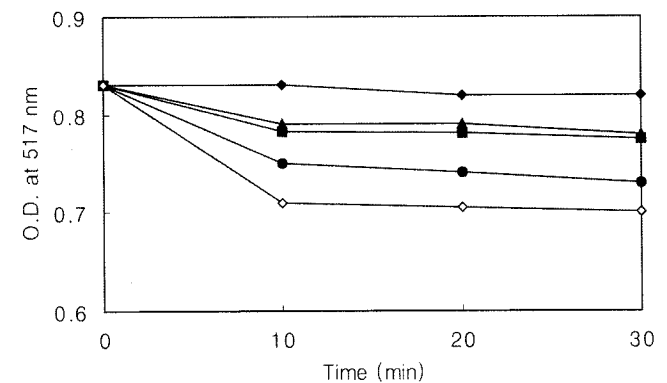


Fig. 2. Electron-donating ability of DPPH to browning reaction products.

◆: control; DPPH solution added dH₂O, ■: PGA (pH 7.0), ▲: PGA (pH 8.2), ●: glucose-PGA (pH 7.0), ◇: glucose-PGA (pH 8.2).

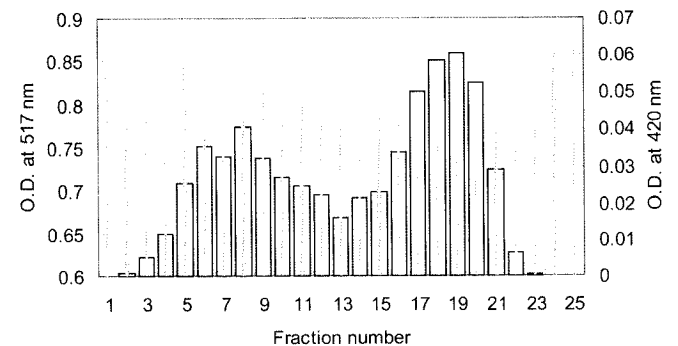


Fig. 3. Browning development and electron-donating ability of browning reaction products fractionated from glucose-PGA (pH 8.2) by Sephadex G-50.

□: Brown color intensity, —: electron-donating ability of DPPH.

비교적 갈변도가 높으면 전자 공여능도 높은 것으로 나타났다. 또한 전반부에서 전자 공여능이 가장 높은 부분은 fraction 7(F-7)이었고 후반부에서는 fraction 20(F-20)임을 알 수 있었고, 큰 차이는 보이지 않지만 F-7보다는 F-20에서 보다 높은 갈변도 및 전자 공여능을 보여주었다. 이는 Glu-PGA(pH 8.2) 갈변 반응 물질의 전자 공여능은 갈변도 및 크기에 밀접한 관계가 있으며, column 전개 후반부에서 용출된 분획물들에서 비교적 높은 전자 공여능이 나타나는 것으로 보아 작은 크기의 갈변 반

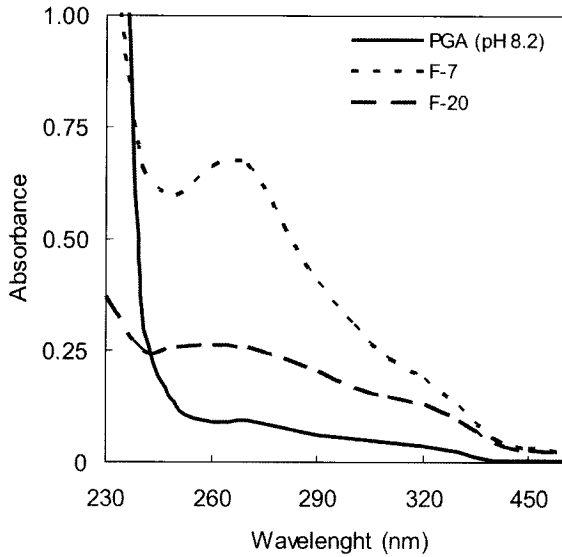


Fig. 4. UV-VIS spectra of browning reaction products, F-7 and F-20 fractionated from glucose-PGA (pH 8.2) by Sephadex G-50.

은 물질들이 전자 공여능이 큰 것으로 사료된다.

분획된 갈변 반응 물질의 UV-VIS 흡수대 특성

Glu-PGA(pH 8.2) 갈변 반응 물질들의 분획물 F-7과 F-20의 UV-VIS 흡수대 결과는 Fig. 4와 같았다. UV-VIS 흡수대에 있어서 Glu-PGA(pH 8.2) 갈변 반응 물질들의 분획물 중 F-20은 최대 흡수대를 갖지 않고 260-320 nm에 걸쳐 완만한 흡수곡선을 나타내었고, F-7은 270 nm 부근에서 특징적인 최대 흡수대를 나타내었다. 그러나 갈변 반응을 시키지 않은 PGA(pH 8.2) 용액은 특징적인 흡수대를 찾아 볼 수 없었다. F-7과 F-20의 흡수대를 갈변 반응을 시키지 않은 PGA(pH 8.2) 용액의 흡수대와 비교해 볼 때, F-7과 F-20은 당과의 반응물이라는 것을 확인할 수 있었고, 특히 F-20의 흡수대는 전형적인 멜라노이드의 흡수대 특성을 나타내었다(13).

분획된 갈변 반응 물질의 분자량 측정

겔 여과로 분획된 Glu-PGA(pH 8.2) 갈변 반응 물질들 중 갈변도 및 전자 공여능이 높은 F-7과 F-20에 대한 분자량을 알아보기 위해서 SDS-PAGE 한 결과(Fig. 5), SDS-PAGE 상에서 F-7은 분자량이 대략 35 kDa의 이상의 범위를 갖는 큰 분자들로 이루어진 갈변 반응 물질임을 알 수 있었고, F-20의 분자량의 범위는 SDS-PAGE 상에서 뚜렷한 크기를 알 수 없었으나, F-7보다 column 전개 후반부에서 용출된 점으로 보아 F-7보다 비교 작은 10 kDa 이하의 저 분자량을 갖는 것으로 사료된다.

결론적으로 Glu-PGA갈변 반응 물질들의 항산화력은 갈변도 및 크기에 따라 차이가 있음을 알 수 있었고, 또한 Glu-PGA의 갈변 반응 물질들은 DPPH를 이용한 전자 공여능에 따른 항산화력 측정에 관한 다른 대두 발효 산물(14-17)들처럼 전자 공여능에 의한 항산화 효과가 있는 하나의 물질이 될 수 있음을 확인하였다.

요 약

청국장 점질물인 PGA의 갈변 및 갈변 반응물질의 분획에 따른 갈변도와 전자 공여능에 따른 항산화력을 알아보았다.

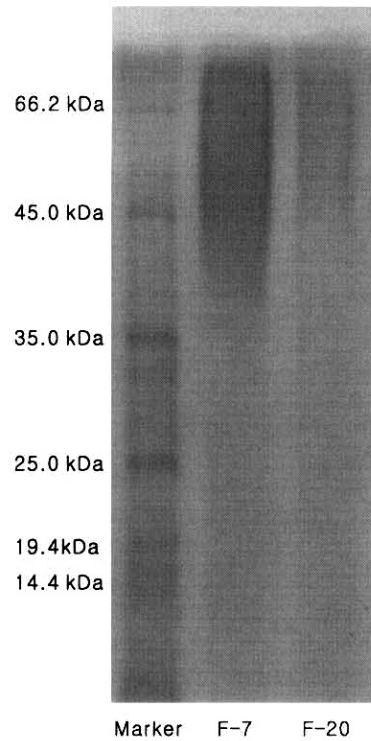


Fig. 5. SDS-PAGE of browning reaction products fractionated from glucose-PGA (pH 8.2) by Sephadex G-50.

Maker: protein standard maker, F-7 and F-20: fraction number of browning reaction products obtained from glucose-PGA (pH 8.2) by Sephadex G-50.

PGA의 갈변은 자체적으로는 갈변이 잘 일어나지 않고, 염기적 조건 하에서 glucose을 첨가하고 가열하면 갈변이 급격하게 일어나며 전자 공여능 또한 높게 나타났다. 염기적 조건 하에서 얻은 PGA 갈변 반응 물질(Glu-PGA, pH 8.2)을 Sephadex G-50을 이용하여 분획하고, 분획에 따른 갈변도 및 DPPH를 이용한 전자 공여능을 측정하였다. 분획된 갈변 반응 물질들은 비교적 광범위한 갈변도 및 전자 공여능을 보여 주었다. 이들 중 갈변도 및 전자 공여능이 상대적으로 높은 F-7과 F-20의 UV-VIS 흡수대에 있어서는 F-20은 멜라노이드의 흡수대인 260-320 nm에 걸쳐 완만한 흡수곡선을 나타내었고, F-7은 270 nm 부근에서 특징적인 최대 흡수대를 나타내었다. 두 분획 물질의 분자량은 SDS-PAGE로 분석한 결과 F-7은 대략 35 kDa 이상으로 나타났고, F-20은 SDS-PAGE상에서 뚜렷한 크기를 알 수 없었으나, F-7 보다는 비교적 저분자량을 갖는 물질이라는 것을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의해 수행된 결과로 이에 감사를 드립니다.

문 헌

1. Shih IL, Van YT. The production of poly-γ-glutamic acid from microorganisms and its variation applications. *Bioresour. Technol.* 79: 207-225 (2001)
2. Jeon EH. Isolation and characterization of aerobic spore-forming bacteria isolated from Chung Guk Jang. MS thesis, Chungang

- University, Korea (2003)
3. Pérez-Camero G, Congregado F, Bou JJ, Muñoz-Guerra S. Biosynthesis and ultrasonic degradation of bacterial poly- γ -glutamic acid. *Biotechnol. Bioeng.* 63: 110-115 (1999)
 4. Kunioka M. Biosynthesis of (γ -glutamic acid) from L-glutamine, citric acid and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 501-506 (1995)
 5. Ashiuchi M, Kamei T, Baek DH, Shin SY, Sung MA, Soda K, Yagi T, Misono H. Isolation of *Bacillus subtilis* (*chungkookjang*), a poly- γ -glutamate producer with high genetic competence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 764-769 (2001)
 6. Lee Y, Kim DM, Kim KH. Physico-chemical properties of viscous substance extracted from *Chungkook-jang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 23: 599-640 (1991)
 7. Park SK, Kyung KH. Stimulatory effect of oxygen on the browning of a soy sauce model system. *Korean J. Food Sci. Technol.* 23: 523-525 (1991)
 8. Kwon DJ, Kim YJ, Kim HJ, Hong SS, Kim HK. Changes of color in *Doenjang* by different browning factors. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 1000-1005 (1998)
 9. Son JY, Kim DH. Effects of caffeic acid on the antioxidant activity of Maillard reaction product. *Food. Biotechnol.* 3: 144-147 (1994)
 10. Lim WY, Kim JS, Moon GS. Antioxidative effect and characteristics of different model melanoidins with same color intensity. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 1045-1051 (1997)
 11. Moon GS, Cheigh HS. Antioxidative characteristics of soybean sauce in lipid oxidation process. *Korean J. Food Sci. Technol.* 19: 537-542 (1987)
 12. Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokemen M, Polissiou M. Antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceas). *Food Chem.* 90: 333-340 (2005)
 13. Moon GS, Cheigh HS. Separation and characteristics of antioxidative substances in fermented soybean sauce. *Korean J. Food Sci. Technol.* 22: 461-465 (1990)
 14. Cheigh HS, Lee JS, Moon GS, Park KY. Antioxidative characteristics of fermented soybean sauce on the oxidation of fatty acid mixture. *Korean J. Food Sci. Technol.* 22: 332-336 (1990)
 15. Shon MY, Seo KI, Lee SW, Choi SH, Sung NJ. Biological activities of *Chungkugjang* prepared with black bean and changes in phytoestrogen content during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 936-941 (2000)
 16. Lee JJ, Cho CH, Kim JY, Kee DS, Kim HB. Antioxidant activity of substances extracted by alcohol from *Chungkookjang* powder. *Korean J. Microbiol.* 37: 177-181 (2001)
 17. Yoo HJ, Lee DS, Kim HB. *Chungkookjang* fermentation of mixture of barley, wormwood, sea tangle, and soybean. *Korean J. Microbiol.* 40: 49-53 (2004)

(2005년 3월 7일 접수; 2005년 6월 20일 채택)