

Development of a Direct Evaluation Method to Measure the Rancidity of *Yeonhaeju* Soybean (*Bazaz*) Powders during Storage via the Fluorescence Spectrum Test

Joo-Tae Uhm¹ and Won-Byong Yoon^{1,2,3,*}

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

³Agriculture and Life Sciences Research Institute, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Fluorescence spectrum test를 이용한 연해주 대두(*Bazaz*) 분말의 저장 중 산패도 측정법 개발

엄주태¹ · 윤원병^{1,2,3,*}

¹강원대학교 바이오산업공학부 식품생명공학전공, ²강원대학교 생명공학연구소

³강원대학교 농업생명과학연구원

Abstract

The rancidity of soybean (*Glycine max* L.) from *Yeonhaeju*, called “*Bazaz*”, in powder forms was evaluated through a fluorescence spectrum test (FST). The results from the FST were validated by comparing the TBA and acid values. Soybean powders were stored in 25, and 90°C for 20 days. The maximum excitation and maximum emission of fluorescent compounds generated from the soybean powder during storage were observed at the 360 nm and 430-440 nm wavelengths, respectively. The mean particle size of soybean powder was maintained at 40 μm to avoid the dependence of the reaction area during measurement. According to the FST results, lipid oxidation did not actively progress during storage at 25°C. The fluorescence intensity (FI) from FST on the first day of storage was not significantly different from that on the last day of storage (day 20; $p < 0.05$), but the FI dramatically increased at 90°C. A smooth increase was observed in the initial stage; then, after 11 days of storage, the FI value increased by nearly 100% compared to that on the first day. The FI values were compared with TBA and acid values that were measured under the same storage conditions. All the values at 25°C showed similar patterns during storage, but at 90°C, the FI and acid values showed similar patterns but the TBA decreased after reaching the maximum values on storage day 12. The results demonstrated that FST may be useful for measuring the rancidity of the powder form of soybean because it does not require extraction to measure the rancidity.

Key words : Fluorescence spectrum test, TBA value, Acid value, oxidation, *Yeonhaeju* soybean powder

서 론

콩은 우수한 단백질과 불포화지방산 함량이 높은 지방, 탄수화물 및 비타민, 미네랄 등 미량 영양성분을 갖춘 식품일 뿐 아니라 여러 가지 생리활성을 가져 식품소재로서 많이 사용되고 있다(1). 대두는 청국장, 된장, 간장, 두부,

식용유 등 다양하게 가공에 이용되고 있으며 대두 분말 또한 식품산업에서 가공제품의 영양적 가치를 높이기 위해서 첨가물로 광범위하게 사용되고 있다(2,3). 대두의 분말화 공정에서 분쇄는 식품의 물리적 형태를 바꾸는 것뿐만 아니라 분말화 하여 원료에 비해 표면적을 증가시키고, 조직 세포를 파괴하여 세포 속에 있는 성분이 노출되게 하여 건조, 추출, 용해와 같은 조작을 촉진하는 효과로 제품의 생산성에 영향을 줄 수 있고 또한 맛, 향기, 식감 등을 향상시킬 수 있다(4,5).

*Corresponding author. E-mail : wbyoon@kangwon.ac.kr
Phone : 82-33-250-6459, Fax : 82-33-241-0508

그 중에서 연해주 대두(*Baza*)는 항산화 능이 있고 지방 함량이 24%로 일반대두에 비하여 높다. 또한 청정 연해주 지역에서 재배되는 작물로 비유전자조작작물로 간주되어 국내 소비자 선호도가 높아 소비가 증가하는 추세이다. 이러한 대두를 수입하는데 사용의 편리성과 관세규정의 이점으로 인해 분말화 된 대두를 수입하게 되는데 분쇄 공정을 거치게 되면 대두와 산소가 접촉하는 면적이 증가하여 지질의 산화가 빠르게 진행되어 품질저하의 원인이 될 수 있다 (6). 현재 유기농 두부 등의 제조에 사용되는 호주산 대두는 수입 시 운송거리가 멀어 산화되는 경향이 높아 질소치환과 같은 특수한 포장법을 사용하여 국내에 수입된다. 이와 같은 포장법은 수입가격의 인상요인이 된다. 연해주와 같이 근거리 운송이 가능한 지역에서 대두 분말의 수입은 특수 포장법이 불필요하고 그로인해 포장가격이 줄어들어 장거리 운송 시 보다 가격적으로 이점을 가질 수 있다.

산패로 이어지는 고도 불포화 지방의 산화는 지질 함량이 매우 작은 경우에도 식품의 품질을 저하시키는 주요원인 중 하나이다. 산화 과정은 여러 복잡한 반응을 포함하고, 단백질, phospholipids, 핵산과 함께 보조 산화 물질의 상호작용으로 인해 특유의 형광 스펙트럼을 보여주는 발색단을 생산 할 수 있는데(7-9), 이러한 형광 스펙트럼은 산화물질에 뿐만 아니라 다양한 아미노산과 고분자 aldehydes 반응으로 형성된 청색 영역의 스펙트럼을 형성하는 형광 화합물을 만들어 내는 것으로 알려져 있다(10). 산패도를 측정하는 방법은 peroxide value와 2-thiobarbituric acid(TBA) value와 같은 측정 방법이 있는데 이러한 측정방법은 분말상태에서 유지를 추출하는 공정이 사용되며 이에 따라 추출 시 소요되는 시료의 양과 추출시간 및 추출 공정 중에서 실험 오차를 유발하는 단점이 있다(11). 예를 들어, peroxide value는 물질의 초기 자동산화의 peroxide 형성에 대해서만 적용이 가능하다(12). 산화 과정 동안 peroxide value는 최고값에 도달한 후 감소 할 수 있다(11).

이와 같은 단점을 보완하기 위해 형광분광법(fluorescence spectrum test, FST)을 이용하여 유지 추출 공정을 최소화하여 분말 상태의 대두의 산패도를 측정하는 방법을 개발하고자 한다. 형광분광법은 빠르고, 비파괴적인 측정방법이다 (13). 동물 조직에서 노화와 관련된 형광 lipofuscin 색소는 아미노 화합물과 peroxides의 반응에서 나온 것으로 가정하여 산화 지질과 단백질의 상호작용으로부터 나온 형광물질을 이용하여 형광분광법은 식품에서 산화 변패의 평가에도 시도된 적이 있다(14). 대두 분말은 산업적으로 응용되어지기 위하여 장시간 유통이 필요하며 이에 따라 유통 중 산화에 의하여 변화 될 확률이 높다. 대두유의 산패에 의한 품질 변화는 많은 연구가 되어 있지만, 대두분말의 산패도 측정에 관한 연구는 미미하다.

본 연구에서는 현재 국내에 비유전자조작물로 수입가격이

높아지고 있는 연해주 대두(*Baza*)의 분말상을 25°C와 90°C에서 20일 동안 저장하면서 형광분광을 이용하여 산화에 영향을 미치는 변수를 조사하고, 형광광도계를 이용하여 대두 분말 저장 중의 산패도를 유지의 추출과정 없이 직접 측정하는 방법을 확립하는 것이 목적이다.

재료 및 방법

대두 분말 제조

본 연구에 사용한 연해주 대두(*Baza*)는 (주)들살림(Gangneung, Korea)에서 공급 받았으며, 대두 200 g을 다기능분쇄기(KSP-35, Korea medi Co, LTD, Korea)를 이용하여 1분간 분쇄하여 실험에 사용하였다.

시약 제조

형광분광법에 사용되는 클로로포름-메탄올 용액(CM solution)은 chloroform : methanol을 2 : 1 (v/v)의 비율로 혼합하여 제조하였다. TBA test에 사용되는 시약 TCA solution은 2 M H₃PO₄를 만들어 200 g의 TCA시약과 2 M H₃PO₄용액을 혼합하여 만들었다. 0.01 M 2-thiobarbituric acid(Sigma-Aldrich) solution(TBA)은 시약 1.4709 g을 증류수에 넣어 1 L를 만들었다. Isoamyl alcohol(Junsei)과 pyridine(Sigma-Aldrich) solution은 각각 400 mL, 200 mL을 혼합(2 : 1, v/v)하여 만들었다. 모든 시약은 빛에 노출을 막기 위해 갈색병, 어두운 곳에 보관하였다.

시료의 저장

시료는 25°C, 90°C의 온도로 저장하였으며, 90°C dry oven(JISICO, Seoul, Korea)에 넣어 고르게 펼쳐 산소와 접촉하는 면적을 같게 한 후 20일 동안 저장하면서 관찰하였다.

입자크기의 측정

분말화 된 대두입자의 크기는 입도분석기(Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd, UK)를 이용하여 측정하였다. 본 실험은 대두 200 g을 1분간 분쇄하여 실험하였지만 입자크기에 따른 intensity를 측정하는 실험에서는 입자크기별로 시료를 나누기 위해 미분쇄기로 대두 200 g을 15초 분쇄하여 입자를 크기별로 나눌 수 있도록 하였다. 체로 나누지 않은 일반 시료를 control로 하고 시료를 체를 이용하여 20 mesh이하, 20~40 mesh, 40~60 mesh, 60~100 mesh로 나눈 시료의 평균입자크기를 분석하였다. 20 mesh이하의 입자크기를 가진 대두 분말은 평균입자크기가 입도분석기로 분석할 수 없이 커서 제조사가 제공한 mesh별 입자크기를 사용하였다.

형광분광법 (fluorescence spectrum test, FST)

시료를 0.5 g 넣은 15 mL test tube에 CM solution을 10 mL를 가해 시약과 시료가 충분히 섞일 정도로 섞어준 후 10분간 반응 시켰다. 10분 후 syringe와 syringe filter를 이용하여 용액을 모두 거른 후 걸러진 용액 6 mL와 증류수 2 mL를 가하여 섞어주었다. 섞인 용액을 원심분리기 (UNION 32R Plus, Hanil science Industrial, Incheon, Korea)에 넣고 1000 × g의 속도로 10분간 원심분리 한 후 시료의 상층액 2 mL를 측정용기에 넣어 fluorescence spectrometer (Perkin Elmer LS-55B, Perkin Elmer Asia, USA)로 emission 400~500 nm, excitation 360 nm, slit 5.0 mm, 측정간격 600 ms로 하여 측정하였다.

TBA test

시료를 2 g 넣은 50 mL test tube에 TCA solution 2 mL, TBA solution 4 mL를 가한 후 섞은 후 90°C water bath(BW-05G, JEIO TECH, Daejeon, Korea)에서 15분간 중탕하고 ice bath에서 15분간 식혔다. Isoamyl alcohol과 pyridine solution 혼합 용액을 6 mL 가한 후 교반하고 원심분리(2400rpm, 15분) 한 후 상층액을 96well plate에 200 µL를 취해 elisa(iMark Microplate Reader, Bio-Rad laboratories, Inc., California, USA)를 이용해 파장 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

산가 측정

산가(acid value)를 측정하기 위해 각 저장기간 별 시료 150 g을 취해 2 L의 hexane에 24시간 동안 방치시킨 후 농축하는 과정을 통해 기름을 추출하였다. 산가 측정은 추출한 기름을 소량 정량하여 95% ethanol, diethyl ether 혼합 용액에 녹인 후, 1% 페놀프탈레인 지시약을 첨가한 뒤 0.1 N KOH 용액으로 붉은색을 떨 때까지 적정하여 아래 식을 이용하여 산가를 계산하였다.

$$AV = \frac{\text{적정량} \times 5.611 \times KOH\text{역가}}{\text{시료의 양}(g)}$$

측정 및 통계분석

모든 실험은 3반복 측정하였으며, 모든 저장 실험에 사용된 시료는 일괄 구매 후 혼합하여 저장실험 시에 사용한 시료는 random하게 표본을 수집하여 사용하였다. 본 연구의 실험은 데이터들 간의 유의성이 나타난 자료에는 ANOVA(분산 분석)에 의한 유의성 검정(MS-Excel 2010)을 이용하여 통계분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

Fluorescence spectra

Fluorescence의 intensity를 측정하기 위해 360 nm로

excitation 시켜 400~500 nm 사이로 파장대를 스캔하여 fluorescence intensity(FI)를 측정하였다. Fig. 1에서 나타난 바와 같이 emission spectra에서 430~440 nm의 값이 최고값으로 파장의 크기가 크고 구분이 잘되는 것을 알 수 있었다. 이 같은 스펙트럼은 Estévez 등(15)의 고기의 근섬유단백질의 oil-in-water 이물질에서 발생한 산화정도를 측정하기 위하여 fluorescence 측정법을 사용하여 얻은 스펙트럼과 유사한 경향을 보여주었다. 본 연구에서는 산패도의 비교를 위해 이 파장대를 기준으로 하여 최고값을 선택하여 값을 평가하였다.

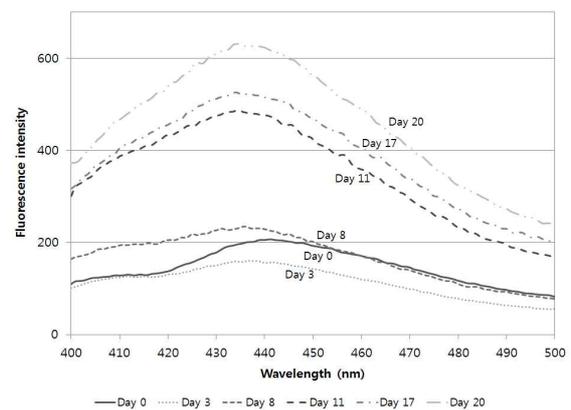


Fig. 1. An example of fluorescence spectra(lexcitation = 360 nm) in organic phase of chloroform/methanol extractions.

입자크기에 의한 fluorescence intensity(FI)

평균입자크기에 대한 자세한 내용은 Table 1에 표시하였다. 입자 분석한 그림은 Fig. 2에 표시하였다. 입자의 평균크기는 mesh크기가 커질수록 작아졌다. 20~40 mesh와 40~60 mesh의 입자크기의 차이가 9배 이상인데 이것은 대부분말이 40 mesh에 비교적 많이 걸리지 않은 분말이 많아서 크기의 차이가 생겼다. 또한 비표면적을 보았을 때 입자크기가 작아질수록 비표면적이 커지는 것을 알 수 있다. 입자크기에 의한 대두 분말의 FI를 Fig. 3에 나타내었다. 입자의 크기가 작아질수록 유의미하게 intensity가 높아지는 것을 알 수 있었다. 이것은 같은 시간을 반응 시켰을 때 입자의 크기가 작으면 반응할 수 있는 면적이 넓어져 같은 시간

Table 1. Particle size and specific surface area of soybean powder

	Particle size(µm)	Specific surface area(m ² /g)
*Control	403.30	0.181
Below 20 mesh	850.00	-
20~40 mesh	751.47	0.132
40~60 mesh	83.18	0.235
60~100 mesh	55.36	0.273

* Control was prepared by grinding soybeans for 15 sec.

동안 용출되어 나오는 산화 물질이 더 많다고 할 수 있다. 이 실험을 통해 입자도가 intensity에 영향을 주는 인자라는 것을 인지하고 본 실험에서는 대두분말의 수입 시 가공식품 원료로 적용되어 관세율의 감면이 가능한 크기인 1.25 mm 금속망체 통과율 95%를 유지하기 위하여 시료를 1분 동안 분쇄하여 얻은 평균 입자크기를 40 μm를 기준으로 하여 입자크기에 영향을 받지 않는 범위에서 실험을 실시하였다.

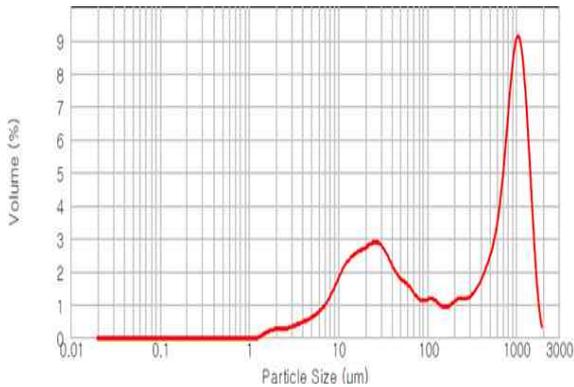


Fig. 2. Particle size distribution of 15 second grinding process of soybean.

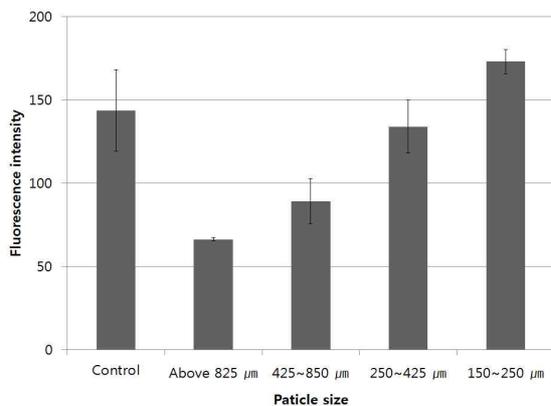


Fig. 3. Fluorescence intensity upon the particle size of soybean powder. (Control was prepared by grinding soybeans for 15 sec. The mean particle size and the specific surface area of control are 403.30 μm and 0.181m²/g, respectively.)

Fluorescence spectrum

본 실험에서는 저장온도를 25℃, 90℃로 저장하여 측정된 산패도는 Fig. 4에 나타내었다. 저장기간 중에 25℃에서는 FI가 큰 변화 없이 거의 동일하게 이어지는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 25℃의 온도가 자동산화에 미치는 영향이 적어 초기 산패도 변화에 영향을 주지 않기 때문으로 생각된다. Lee 등(16)은 포장재질에 따른 유과의 저장에서 저장온도 25℃에서 산패가 진행되지 않는 경향을 보였으며, Lee 등(17)의 팜유로 튀긴 유과의 저장연구에서도 20℃의 저장온도에서 FI가 증가하지 않아 본 연구결과와

일치하였다. 반면, 90℃에서는 FI가 유의하게 증가하는 경향을 보였는데, 8일에서 11일 사이에 값이 크게 올랐으며 그 후에 일정하게 증가하는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Shin 등(18)과 Liang 등(19)과 Liang(11)의 연구에서 나타난 온도에 의해 급격하게 올라가는 경향과 일치함을 알 수 있었다. 온도가 산화의 진행에 영향을 주어 25℃보다 더 빠른 산화 진행 속도를 보여주었다.

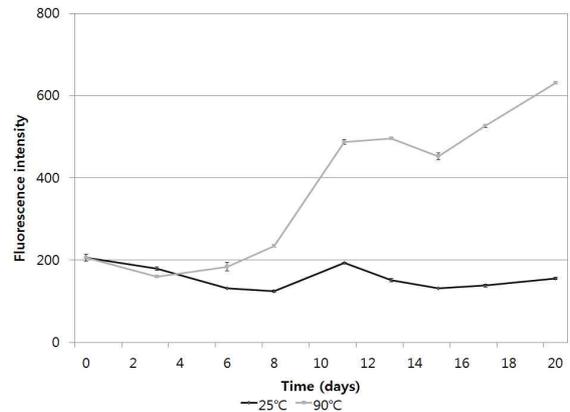


Fig. 4. Changes of fluorescence intensity during storage of Yeonhaeju soybean powder at 25℃ and 90℃.

TBA가

Fluorescence와 마찬가지로 25℃, 90℃를 저장온도로 하여 20일 동안 저장하며 측정하였다. 측정한 데이터는 Fig. 5에 나타내었다. 25℃는 FST와 비교하여보면 유사한 경향이라고 할 수 있다. 초기값과 비교하여 저장기간 동안 값의 차이가 크지 않고 비슷한 값이 유지되는 것을 볼 수 있었다. 90℃에서는 0일차에서부터 꾸준히 증가하는 경향을 보인다 11일을 기준으로 유의차(p < 0.05)있게 감소, 증가, 감소하는 경향을 보였다. 후반부에 감소하는 경향은 FST와의 경향과 차이를 보였으나 Liang(11)은 TBA value는 산패의 최고점에 도달한 후 oleic acid와 linoleic acid의 영향으로

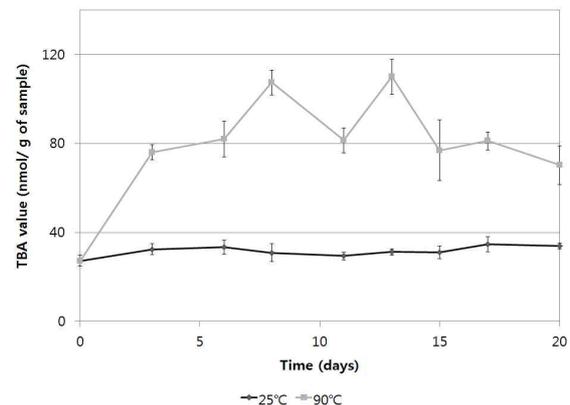


Fig. 5. Change of TBA values during storage of Yeonhaeju soybean powder 25℃ and 90℃.

인해 감소할 수 있음을 보여주었다. 이는 TBA 측정법에서 나오는 현상으로 일반적으로 산화가 진행된 후에 산패도는 크기가 줄어들 수 없다. 대두분말의 경우와 같이 원산지에서 분말화하여 수입을 하는 경우 장기간의 유통기간 중의 산패도를 정확하게 측정하는 방법이 필요하나, TBA나 POV의 경우 이와 같이 산패의 진행 후 일정 시간 경과 후 저감되는 현상이 발견되므로 장기간의 수송을 통하여 산업적으로 사용되는 대두분말의 경우 사용에 어려움이 있을 것으로 판단된다.

산가

산가 측정법에 의한 실험 결과는 Fig. 6에서 볼 수 있었다. 25°C 저장에서는 다른 실험방법과 같이 측정값이 증가하거나 감소하지 않고 초기값과 유의차 없이 진행되는 경향을 볼 수 있었다. 이것은 FST와 TBA value의 경향과 일치하고 Lee 등(16)이 실험한 유과를 25°C에서 저장한 실험과 같은 경향을 나타내는 것을 볼 수 있었다. 이것은 25°C에서 20일 저장한 대두는 산패가 진행되지 않는다는 것을 알 수 있다. 90°C에서는 0일차에서부터 20일차까지 꾸준히 증가하는 경향을 보였다. 산가 측정값이 초기값에서 17배가 증가하였다. 이 또한 경향이 FST와 일치하며 TBA value의 중간상승 구간까지의 경향과 일치한다고 할 수 있다. 또한 Lee 등(17)과 Shin 등(18), Liang(11)에서 보고된 논문에서 변화되는 경향과 유사한 모습을 볼 수 있었다. 이것은 온도가 90°C일 때 산패속도가 급격히 증가됨을 알 수 있었다. 전체적인 경향은 Liang 등(19)의 연구에서 나온 결과와 FST, TBA value와 같은 경향을 형성하는 것을 볼 수 있었다.

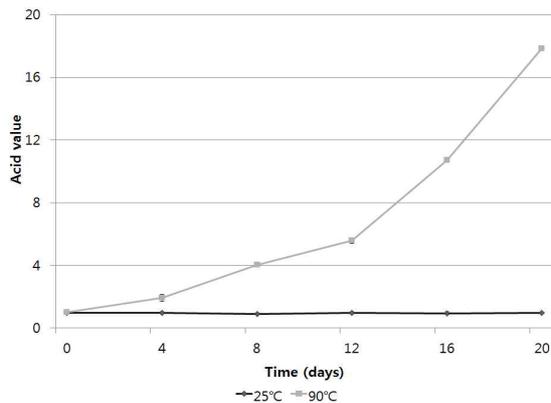


Fig. 6. Changes of acid value during storage of *Yeonhaeju* soybean powders at 25°C and 90°C.

요 약

본 실험은 형광분광법을 이용하여 분말화된 대두의 산패도를 유지의 추출과정 없이 직접 측정하는 방법을 확립하기

위해 실시하였다. FST와, TBA test, 산가 측정법을 이용하여 25°C와 90°C에서 20일 동안 저장하면서 산패도에 따라 값을 비교하였다. 25°C에서 저장 기간 중의 산패도는 변화가 없음을 알 수 있었다. 모든 측정치들은 초기값에 비해 20일 후의 값이 크게 차이 없이 일정한 것을 알 수 있었다. 반면 90°C에서는 FST의 경우 8일에서 11일 사이에 FI값이 크게 증가하는 경향을 보인 후 일정하게 값이 증가하는 경향을 볼 수 있었는데 TBA test에서는 0일에서 꾸준히 증가하던 값이 다시 감소하는 것을 보였으며 이는 oleic acid와 linoleic acid의 함량이 높은 대두의 특징이라 할 수 있다. 본 연구에서 실험한 시료의 경우 산가는 FST와 같은 경향을 보여주었다. 본 연구의 중요한 결과는 FST를 이용하여 대두의 산패를 분말상에서 직접 측정하는 법을 확립한 것이며 이는 일반적으로 사용되는 TBA test와 산가를 이용한 직접측정법에 비해 측정시간이 빠르며 추출과정에 의한 오차를 최소화 할 수 있음을 보여주었다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부, 강원도, 강릉시, 강릉과학산업진흥원의 연구개발사업으로 수행된 연구결과입니다.

참고문헌

- Kim SO (2006) Research and industrial trend of the functional components of soybean. Food Science and Industry, 1, 2-10
- Kim ND, Choi SG, Joo HK (1992) Changes of chemical composition and enzyme activity of soybean by processing method. J Korean Agric Chem Soc, 4, 232-236
- Lígia PB, Susana AB, João AL, José CM (2005) Multi block PLS as an approach to compare and combine NIR and MIR spectra in calibrations of soybean flour. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 75, 91-99
- Chun JK, Kim KH, Mok CK, Lee SJ, Kwon YA (2003) Food Engineering. McGraw-Hill Korea, Inc., Seoul, Korea, p 283-286, 321
- Shu TS, Lee G, Seo YK, Lee KP, Kim DJ (2004) Micro particle technology in food science. Food Science and Industry, 4, 17-21
- Lee SB, Uhm BH, Yoon WB (2011) Effect of high pressure processing on the rancidity of *Yeonhaeju* soybean (*Baza*) powder during storage. Food Engineering Process, 3, 209-213

7. Forss DA (1972) Odor an flavor compounds from lipids. Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids, 13, 181-258
8. Mottram D (1987) Lipid oxidation and flavor in mea and meat products. Food Science and Technology Today, 1, 159-162
9. Frankel EN (1998) Lipid oxidation. Dundee: The Oily Press LDT.
10. Kikugawa K, Takayanagi K, Watanabe S (1985) Polylysine modified with malonaldehyde, hydroperoxylinoleic acid and monofunctional aldehydes. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 12, 5437-5444
11. Liang JH (2000) Kinetics of fluorescence formation in whole milk powders during oxidation. Food Chemistry, 71, 459-463
12. Frankel EN (1993) In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. Trends in Food Science and Technology, 4, 220-225
13. Veberg A, Vogt G, Wold JP (2006) Fluorescence in aldehyde model systems related to lipid oxidation. LWT - Food Science and Technology, 39, 562-570
14. Kikugawa K (1986) Fluorescent products derived from the reaction of primary amines and components in peroxidized lipids. Free Radical Biology and Medicine, 2, 389-417
15. Estévez M, Kylli P, Puolanne E, Kivikari R, Heinonen M (2008) Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation n oil-in-water emulsions. Meat Science, 80, 1290-1296
16. Lee YH, Kum JS, Ahn YS, Kim WJ (2001) Effect of packaging material and oxygen absorbant on quality properties of *Yukwa*. Korean Journal Food Science And Technology, 6, 728-736
17. Lee YS, Jung HO, Lee CO (2003) Quality characteristics of *Yukwa* fried with palm oil during storage, 1, 60-64
18. Shin DH, Chung CK (1998) Chemical composition of the rice germ from rice milling and its oil stability during storage. Korean Journal of Food Science And Technology, 1, 241-243
19. Liang JH, Lin CC (2000) Fluorescence kinetics of soybean flour oxidation. Journal of the American Oil Chemists' Society, 77, 709-713
20. Liang JH (1999) Fluorescence due to interactions of oxidizing soybean oil and soy protines. Food Chemistry, 66, 103-108

(접수 2011년 12월 30일 수정 2012년 4월 24일 채택 2012년 5월 25일)