

녹차 첨가 서리태 청국장의 항산화 증진 효과

조은주¹ · 박현영¹ · 김현영^{2*}

¹부산대학교 식품영양학과 및 노인생활환경연구소, ²경남과학기술대학교 식품과학부

Increased antioxidative effects of Seolitae Chungkukjang added with green tea powders

Eun Ju Cho¹, Hyun Young Park¹, Hyun Young Kim^{2*}

¹Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

²Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea

Received on 25 January 2012, revised on 6 February 2012, accepted on 23 March 2012

Abstract : To increase antioxidative activity and minimize off-flavor of Chungkukjang, Seoliate as main ingredient and green tea as minor ingredient were selected. The protective effect of green tea for Chungkukjang was evaluated under *in vitro*. Seolitae Chungkukjang added with green tea (SCG) was prepared on the basis of the protective effect of green tea from oxidative stress. Green tea showed the strong protective effect against nitric oxide (NO) and superoxide anion (O_2^-) radicals. The SCG preparation method was as follows. Seolitae was cleaned and washed, soaked in 1.5-fold water ($15^\circ C$) of Seolitae weight for 48 hr. Seolitae was steamed about 40 min by autoclave and then cooled about $40^\circ C$. *Bacillus subtilis* was inoculated and 5.0-fold green tea of weight was added, and then it was fermented for 60 hr at $40^\circ C$. According to the preparation method, Seolitae Chungkukjang (SC) and Seolitae Chungkukjang added with green tea 5.0% (SCG5.0) were prepared. Among the Chungkukjang groups SCG5.0 exerted more effective scavenging activity of NO than SC. In addition, SC added with green tea 5.0% showed high O_2^- scavenging effect. These results suggest the antioxidative potential against free radical-induced oxidative damage of SCG.

Key words : Seoliate, Green tea, Chungkukjang, Antioxidative activity, NO, O_2^-

I. 서론

유산소 호흡을 하는 거의 모든 생물체의 세포에서 발생 되는 reactive oxygen species(ROS)는 독성이 매우 강한 물질로서, 생체물질의 자가 산화, 방사선, 화학물질에 의한 외부자극에 의해 생성될 수 있는 것으로 알려져 있다 (Fridovich, 1978; Kodama, 1988). 이러한 활성산소의 종류로는 superoxide anion(O_2^-), hydrogen peroxide(H_2O_2), singlet oxygen(1O_2), hydroxyl radical($\cdot OH$), peroxy radical($RO\cdot$) 등이 있다. 또한 reactive nitrogen species (RNS)로서 nitric oxide(NO)는 반응성이 크고 반감기가 아주 짧은 특징을 갖는 활성산소로 대식세포, 호중구 등에서

생성되며 O_2^- 와 쉽게 반응하여 반응성이 매우 높은 산화제인 peroxynitrite($ONOO^-$)를 생성한다(Maliski 등, 1993; Radi 등, 1991). 이들 활성산소는 여러 가지 환경적 요인이나 병리적인 요인들에 의하여 과잉으로 생성될 수 있으며 이들의 과다 생성과 활성산소를 제거하고 방어하는 항산화 방어체계의 결핍은 항산화 방어체계간의 불균형을 일으켜, 산화적 스트레스를 발생시킨다(Cadenas와 Davies, 2000; Bokov, 2004). 또한 산화적 스트레스의 증가는 암과 심혈관 질환 및 알츠하이머와 같은 만성 질환의 병리학적 진행과 노화과정의 중요한 원인이 되는 것으로 알려져 있다 (Cavalca 등, 2001; Gibson과 Huang, 2005).

청국장은 삶은 콩에 고초균을 번식시켜 만든 전통 발효 식품으로 가장 짧은 기일에 완성할 수 있으면서도 그 품미가 독특하고 영양적, 경제적으로도 가장 효과적인 콩의 섭

*Corresponding author: Tel: +82-55-751-3277

E-mail address: hykim@gntech.ac.kr

취방법으로 인정되고 있다. 또한 최근 많은 연구자들에 의해 콩에서 기인된 isoflavone, phytic acid, saponin, trypsin inhibitor, tocopherol, 불포화지방산, 식이섬유, 올리고당 등의 각종 생리활성물질과 항산화물질 및 혈전용해효소를 다량 함유하고 있기 때문에 기능성식품으로서의 중요성이 강조되고 있다(Pratt 1972; Hammerschmidt와 Pratt, 1978; Pratt와 Bibrac, 1979; Coward와 Barnes, 1993). 오랫동안 청국장이 전통식품으로 사용되어 왔음에도 불구하고 영양학적인 우수성과 생리 기능성에 관한 연구는 비교적 최근에 이루어지고 있다. 청국장에 관한 연구로는 청국장 제조의 발효에 관한 연구가 주를 이루며, 청국장의 기능성에 관한 연구로는 혈중콜레스테롤 저하, 고혈압 예방, 항암, 항산화, 혈전용해 및 골다공증 예방 등 다양한 효과에 대한 보고가 있다(Iwai 등, 2002; Sung 등, 1984; Choe 등, 2004; Youn 등, 2002; Kim 등, 2003; Suh 등, 1982; Yoo 등, 1998; Shon 등, 2002). 반면 기능성 증진에 대한 연구는 그다지 행해지지 않은 실정이다.

항산화 기능성 증진 및 이취제거를 위해 많이 이용되어 지는 녹차는 다양한 기능성이 인정되고 있는데, 특히 항산화효과, 항암효과, 항균효과, 혈압강하효과 등이 알려져 있다(Hibasami 등, 1998; Liao 등, 1995; Yukihiko와 Tadashi, 1989; Okubo 등, 1998; Abe 등, 1995; Sagesaka-Mitane 등, 1996). 또한, 청국장 제조 시 대부분의 경우 대두가 주 원료로 사용되고 있으나, 대두 대신 기능성을 증진시킬 수 있는 재료로서 서리태를 들 수 있다. 서리태는 종피의 안토시아닌 색소가 여러 가지 기능성을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Francis, 1989; Mazza와 Miniati, 1993; Kim 등, 2005). 본 연구에서는 청국장의 항산화 기능성 증진을 위해 부재료로 녹차를 첨가하여 서리태 청국장을 제조한 후 *in vitro*상에서 라디칼 소거능을 살펴보았다.

II. 재료 및 방법

1. 청국장의 제조

선별한 대두와 서리태를 수세하여 1.5배의 물을 첨가하여 15°C에서 48시간 동안 침지하고 수절한 후 121°C에서 40분 동안 증자한 후 냉각시켰다. 녹차분말을 증자콩에 대해 5.0%를 첨가하고 *Bacillus subtilis*를 원료의 0.3% (v/w) 접종하여 40°C에서 60시간 발효시켰다.

2. 시료 조제 및 추출

5.0% 녹차를 첨가한 서리태 청국장 시료를 동결 건조시킨 후 시료 중량 20배의 methanol(MeOH)로 실온에서 12시간 동안 추출하는 과정을 총 3번 반복한 후 회전식 진공농축기를 이용하여 농축시킨 후 -80°C의 냉동고에 보관하면서 항산화 실험에 사용하였다.

3. NO 소거효과

50 mM의 phosphate-buffer에 녹인 각 농도별 시료 200 µL에 5 mM sodium nitroprusside(SNP) solution 800 µL를 혼합하여 25°C에서 150분간 배양하였다. 이 혼합액을 96-well plate에 주입하고 150 µL의 griess reagent를 넣어 실온에서 10분간 배양한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Sreejayan Rao, 1997).

4. O₂⁻ 소거효과

50 mM PBS에 0.125 mM ethylenediaminetetraacetate (EDTA), 62 µM nitro blue tetrazolium(NBT), 98 µM NADH를 혼합한 용액을 96-well plate에 200 µL를 취하고, 50 mM의 phosphate-buffer에 녹인 각 농도별 시료 25 µL를 혼합한 후, 33 µM의 phenazine methosulfate를 혼합하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Ewing과 Janero, 1995).

5. 통계분석

실험 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었고, 대조군과 실험군의 실험 결과는 one way ANOVA로 검증한 후 Duncan's multiple range test로 유의수준 0.05에서 유의성을 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

Nitric oxide는 내피세포 호중구 등에서, 생성될 뿐만 아니라 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 citrulline으로 전환 시에도 생성되며 대부분의 기관에서 세포내 messenger로 작용하고 혈관의 항상성 유지 및 신경전달 물질로서

작용한다. NO는 과잉으로 생성될 경우 단순 세포확산을 통해 iron-sulfur center나 thiol group을 포함한 mitochondrial enzyme을 불활성화시키거나, 분자적 산소와 함께 nitrosating agent를 형성하는 자동산화 과정을 거쳐 DNA deamination을 통한 돌연변이를 일으키거나, O_2^- 와 반응하여 더 강력한 산화제인 ONOO⁻를 생성시킨다(Maliski 등, 1993; Radi 등, 1991). ONOO⁻는 자극을 받은 대식세포, 호중구, 내피세포에서 생성되며, 동맥경화성 심장질환, 급성 폐렴, 만성 염증시 *in vitro*에서도 생성된다. 또한 pKa 6.8에서 peroxyntrous acid(ONOOH)로 전환되어 nitrogen dioxide, nitronium ion 및 hydroxyl radical의 전구체로 작용한다. NO와 O_2^- 에 의해 형성된 ONOO⁻는 *in vitro* 및 *in vivo*에서 가장 강력한 산화제로 단백질, 아미노산, DNA 등과 반응하여 세포 및 조직 손상을 야기할 뿐만 아니라 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 피부 염증 등 여러 질환과 관련되는 것으로 보고되고 있다(Althaus 등, 1994; Haenen 등, 1997; Pannala 등, 1997; Lin 등, 1997; Halliwell, 1997). 따라서 과잉으로 생성된 NO를 제거함으로써 NO에 의한 독성으로부터의 보호효과를 기대할 수 있으며 강력한 산화제인 ONOO⁻의 생성경로를 차단할 수 있다. Table 1은 기능성 증진을 위해 부재료로 사용할 녹차의 NO 소거 효과를 *in vitro* 상에서 검토한 결과로 녹차의 NO 소거능은 아주 우수하여 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 95.5%의 효과를 보였다.

O_2^- 는 활성산소 중 가장 먼저 생성되고 반응성이 약하지만 일부 분자를 직접 공격할 수 있다. O_2^- 는 $\cdot\text{OH}$ 보다 훨씬

느리기는 하나 glutathione peroxidase를 불활성화시킬 수 있으며 부분적으로 catalase를 불활성화시킬 수 있다. 또한 O_2^- 는 DNA를 직접적으로 변형시키지는 못하지만 반응을 촉진할 수 있을 정도의 transition metals이 존재할 때 hydroxyl radicals 형성을 촉진한다. Table 2는 *in vitro*상에서 O_2^- 의 생성을 유도한 후, 녹차추출물의 O_2^- 소거 활성을 측정한 결과이다. 녹차추출물은 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 54.6%, 250 $\mu\text{g/ml}$ 에서 51.9%, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 48.6%의 O_2^- 소거능을 나타내어 모든 농도에서 약 50% 정도의 소거능을 보였으나 농도 의존적이지는 않았다(Table 2).

Table 3은 청국장 MeOH 추출물의 NO 소거효과를 나타낸 결과이다. 일반대두청국장은 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 15.9%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 8.2%의 낮은 NO 소거능을 나타냈다. 서리태 청국장은 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 34.3%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 11.8%를 나타내어 일반청국장보다는 다소 높은 소거능을 나타내었다. 또한 녹차를 5% 첨가한 서리태 청국장은 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 43.5%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 24.2%의 NO 소거능을 나타내어 녹차 첨가 서리태 청국장이 일반대두청국장과 서리태청국장보다 NO 소거효과가 높았다. 또한, 청국장의 *in vitro*에서의 O_2^- 소거효과를 검토한 결과(Table 4), 일반 청국장과 서리태 청국장의 O_2^- 소거효과는 거의 관찰되지 않았다. 반면 SCG5.0에서만 소거효과를 나타내었는데 100 $\mu\text{g/ml}$ 과 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 처리농도에서 각각 20.1%와 33.9%의 O_2^- 소거능을 보였다. 또한 이전의 연구에서 녹차 5% 첨가 서리태 청국장이 관능검사결과에서 향, 맛 및 종합적 기호도가 일

Table 1. NO scavenging activity of the MeOH extract from green tea.

| Material | Concentration ($\mu\text{g/ml}$) | NO scavenging effect (%) |
|-----------|------------------------------------|-----------------------------|
| Green tea | 5 | 35.5 \pm 1.5 ^c |
| | 10 | 38.9 \pm 1.4 ^c |
| | 50 | 95.5 \pm 4.6 ^a |
| | 100 | 89.1 \pm 4.6 ^b |

Values are mean \pm SD.

^{a-c}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

Table 2. Superoxide anion scavenging activity of green tea.

| Material | Concentration ($\mu\text{g/ml}$) | O_2^- scavenging effect (%) |
|-----------|------------------------------------|-------------------------------|
| Green tea | 100 | 54.6 \pm 2.6 ^a |
| | 250 | 51.9 \pm 2.3 ^b |
| | 500 | 48.6 \pm 1.8 ^c |

Values are mean \pm SD.

^{a-c}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

Table 3. NO scavenging activity of Chungkukjang.

| Materials | Concentration ($\mu\text{g/ml}$) | NO scavenging effect (%) |
|-----------|------------------------------------|------------------------------|
| Control | 5 | 13.1 \pm 3.7 ^{cd} |
| | 10 | 10.5 \pm 0.8 ^d |
| | 50 | 15.9 \pm 1.5 ^c |
| | 100 | 8.2 \pm 0.5 ^d |
| SC | 5 | 6.7 \pm 0.8 ^e |
| | 10 | 10.2 \pm 2.0 ^d |
| | 50 | 34.3 \pm 0.3 ^b |
| | 100 | 11.8 \pm 0.6 ^{cd} |
| SCG5.0 | 5 | — |
| | 10 | — |
| | 50 | 43.5 \pm 2.1 ^a |
| | 100 | 24.2 \pm 0.4 ^{bc} |

Values are mean \pm SD.

^{a-c}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

Control: Soybean Chungkukjang, SC: Seolitae Chungkukjang, SCG5.0: SC added with green tea 5.0%

Table 4. Superoxide anion scavenging activity of Chungkukjang.

| Material | Concentration ($\mu\text{g/ml}$) | O ₂ ⁻ scavenging effect (%) |
|----------|------------------------------------|---|
| SCG5.0 | 100 | 20.1 \pm 1.4 ^b |
| | 250 | 20.6 \pm 0.9 ^b |
| | 500 | 33.9 \pm 1.3 ^a |

Values are mean \pm SD.

^{a-b}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

SCG5.0: SC added with green tea 5.0%

반청국장에 비해 우수한 것으로 나타났다(Park과 Cho, 2008). 따라서 녹차 5% 첨가 서리태 청국장이 관능적 특성은 물론 항산화 활성을 증진시킬 것으로 사료된다.

유발된 산화적 스트레스를 개선함으로써 이로 인한 질병을 예방하는 항산화제로서 역할을 할 것으로 사료된다.

IV. 결론

본 연구에서는 청국장의 항산화 기능성증진과 관능적 품질개선을 위해 서리태에 녹차를 첨가하여 청국장을 제조한 후 항산화능을 검토하였다. 먼저 항산화 기능성 증진을 위해 사용할 부재료인 녹차는 NO와 O₂⁻에 대한 소거능이 우수하여 활성산소의 연쇄반응을 blocking할 수 있는 활성산소 소거제로써의 뛰어난 기능을 확인하였으며 이러한 결과를 바탕으로 녹차를 첨가하여 서리태청국장을 제조한 후 항산화활성을 검토한 결과, 녹차 5% 첨가한 서리태청국장이 *in vitro*상에서 NO와 O₂⁻ 소거능이 우수함을 확인하였다. 따라서, 녹차 첨가 서리태 청국장은 NO와 O₂⁻에 의해

참고 문헌

- Abe Y, Umemura S, Sugimoto K, Hirawa N, Kato Y, Yokoyama T, Iwai J, Ishii M. 1995. Effect of green tea rich in gamma-aminobutyric acid on blood pressure of Dahl salt-sensitive rats. *Am. J. Hypertens.* 8: 74-79.
- Althaus JS, Oien TT, Fici GJ, Scherch HM, Sethy VH, von Voigtlander PF. 1994. Structure activity relationships of peroxynitrite scavengers an approach to nitric oxide neurotoxicity. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 83: 243-254.
- Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A. 2004. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech. Ageing Dev.* 125: 811-826.
- Cadenas E, Davies KJ. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29: 222-230.

- Cavalca V, Cighetti G, Bamonti F, Loaldi A, Bortone L, Novembrino N, De Franceschi M, Belardinelli R, Guazzi MD. 2001. Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. *Clin. Chem.* 47: 887-892.
- Choe JS, Kim JS, Yoo SM, Park HJ, Kim TY, Chang CM, Shin SY. 2004. Survey on preparation method and consumer response of Chungkukjang. *Korea Soybean Digest.* 13: 29-43.
- Coward L, Barnes S. 1993. Genistein, daidzein and their β -glycoside conjugates: Antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1961-1967.
- Ewing JF, Janero DR. 1995. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal. Biochem.* 232: 243-248.
- Francis FJ. 1989. Food colorants anthocyanins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 28: 273-314.
- Fridovich I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880.
- Gibson GE, Huang HM. 2005. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 26: 575-578.
- Haenen GRMM, Paquay JBG, Korthouwer REM, Bast A. 1997. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236: 591-593.
- Halliwell B. 1997. Hypothesis : What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation *in vivo*? *FEBS Lett.* 411: 157-160.
- Hammerschmidt PA, Pratt DE. 1978. Phenolic antioxidants of dried soybeans. *J. Food Sci.* 43: 556-559.
- Hibasami H, Komiya T, Achiwa Y, Ohnishi K, Kojima T, Nakanishi K, Hara Y. 1998. Induction of apoptosis in human stomach cancer cells by green tea catechins. *Oncol. Rep.* 5: 527-529.
- Iwai K, Nakaya N, Kawasaki Y, Matsue H. 2002. Antioxidative functions of natto, a kind of fermented soybeans: Effect on LDL oxidation and lipid metabolism in cholesterol fed rats. *Agric. Food Chem.* 50: 3597-3601.
- Kim SH, Kwon TW, Lee YS, Choung MG, Moon GS. 2005. A major antioxidative components and comparison of antioxidative activities in black soybean. *J. Korean Food Sci. Technol.* 37: 73-77.
- Kim YS, Jung HJ, Park YS, Yu TS. 2003. Characteristics of flavor and functionality of *Bacillus subtilis* K-20 Chungkukjang. *J. Korean Food Sci. Technol.* 35: 475-478.
- Kodama M. 1988. Role of active oxygen species in carcinogenesis. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 33: 3136-3143.
- Liao S, Umekita Y, Guo J, Kokontis JM, Hiipakka RA. 1995. Growth inhibition and regression of human prostate and breast tumors in athymic mice by tea epigallocatechin gallate. *Cancer Lett.* 96: 239-243.
- Lin KT, Xue JY, Sun FF, Wong PYK. 1997. Reactive oxygen species participate in peroxynitrite induced apoptosis in HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230: 115-119.
- Maliski T, Tah Z, Grinfeel DS., Patton S, Kapruczak M, Tombouliau P. 1993. Diffusion of nitric oxide in the wall monitored in situ by porphyrinic microsensors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193: 1076-1082.
- Mazza G, Miniati E. 1993. Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. p 29-40.
- Okubo S, Sasaki T, Hara Y, Mori F, Shimamura T. 1998. Bactericidal and antitoxin activities of catechin on enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Kansenshogaku Zasshi* 72: 211-217.
- Pannala AS, Rice-Evans CA, Halliwell B, Singh S. 1997. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232: 164-168.
- Park HY, Cho EJ. 2008. Radical scavenging effects and physicochemical properties of seolitae Chungkukjang added with green tea. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 401-404.
- Pratt DE. 1972. Water soluble antioxidant activity in soybean. *J. Food Sci.* 37: 322-323.
- Pratt DE, Bibrac PM. 1979. Source of antioxidant activity of soybean and soy products. *J. Food Sci.* 44: 1720-1722.
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. *J. Biol. Chem.* 266: 4244-4250
- Sagesaka-Mitane Y, Sugiura T, Miwa Y, Yamaguchi K. 1996. Effect of tea leaf saponin on blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Yakugaku Zasshi* 116: 388-395.
- Shon MY, Kim MH, Park SK, Park JR, Sung NJ. 2002. Taste components and palatability of black bean Chungkukjang added with kiwi and radish. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 39-44.
- Sreejayan Rao MN. 1997. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J. Pharm. Pharmacol.* 49: 105-107.
- Suh JS, Lee SG, Ryu MK. 1982. Effect of *Bacillus* strains on the Chungkook-jang processing. *J. Korean Food Sci. Technol.* 14: 309-314.
- Sung NJ, Ji YA, Chung SY. 1984. Changes in nitrogenous compounds of soybean during chungkookjang koji fermentation. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 13: 275-284.
- Yoo CK, Seo WS, Lee CS, Kang SM. 1998. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme excreted by *Bacillus subtilis* K-54 isolated from Chung guk jang. *J. Korean Appl. Microbiol. Bioeng.* 26: 507-514.
- Youn KC, Kim DH, Kim JO, Park BJ, Yook HS, Cho JM, Byun MW. 2002. Quality characteristics of the Chungkookjang fermented by the mixed culture of *Bacillus natto* and *B. licheniformis*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 204-210.
- Yukihiko H, Tadashi I. 1989. Antibacterial activities of tea polyphenols against foodborne pathogenic bacteria. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 36: 996-999.