

겨자(*Brassica juncea*) Methanol 추출물의 항산화 효과

崔圭泓 · 尹衡植 · 金貞淑*

경북대학교 농과대학 식품공학과

*계명전문대학 식품영양학과

Antioxidative Effectiveness of Methanol Extract in Mustard

Choi, Kyoo Hong · Yoon, Hyung Sik · Kim, Jeong Sook

Dept. of Food Science and Technology, Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

*Dept. of Food and Nutrition, Keimyung Junior College

Summary

In this study, antioxidative effectiveness of BHA, BHT of 0.02% was compared to that of separated phenolic acid, ester form and insoluble phenolic acid were extracted from 50g mustard seed removed fat antioxidative effectiveness was assumed, measuring Peroxide value, TBA value for 5 days, storing respective substrate and contrast tube at $45 \pm 1^\circ\text{C}$ for 25 days.

1. Laboratory tube was added by BHA, BHT separated phenolic acid ester form and insoluble phenolic acid extract and peroxide value of contrast tube after 25 days storage were 31.9, 13.2, 16.6, 11.2, 35.91.

On the other hand at the same condition TBA of each antioxidativity matter were 0.24, 0.16, 0.19, 0.17, 0.27, 0.35 as a result remarkably appeared antioxidative effectiveness in meal soybean oil substrate.

2. Total phenolic contents of free phenolic acid and insoluble phenolic acid in mustard were 13.2mg/10ml, 340.5mg/10ml, 2.1mg/10ml.

3. Phenolic acid separated and identified were catechol, methylcatechol, salicylic acid, cinnamic acid, p-hydroxybenzoic acid, syringic acid, caffeic acid, sinapic acid.

서 론

근대의 식생활에서 지방질 식품가공의 다양화는 급증하고 있는 형편이다.

이들의 가공 및 저장에 따른 문제점은 품질열화와 독성문제로서 오래 전부터 야기되어 왔고 그중에서도 인공 산화방지제들의 독성에 대한 문제점이 많아짐에 따라

1,4,9,27) 천연 항산화성 물질에 대한 탐색연구가 많이 이루어 지고 있다.

Chipault등⁸⁾은 물-기름 emulsion 및 돼지 기름에 대하여 clove, rosemary, sage 등이 항산화 효과가 있다고 보고하였으며 Kihara등¹³⁾은 생강, clove, thyme, piment, larual, mace, cinnamon들이 과자류와 고구마 칩에서 항산화 효과를 나타냈다고 보고하

였다.

Hideharu등⁸⁾은 생강, 고추, turmeric들의 알코올 및 에테르 추출물이 리노렌산-메틸에 대하여 항산화 효과가 있음을 보고하였고, Saito등²⁵⁾은 생강, rosemary, sage, mace, thyme, marjoram, clove등의 석유, 에테르 가용분과 불용분은 모두 강한 항산화 효과가 있음을 보고하였다.

또 Chang등⁵⁾은 rosemary의 에테르 추출물이 BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene), PG(propyl galate)들보다 식물유에 비하여 강한 항산화 효과를 나타냈음을 보고하였다.

천연 항산화제 또는 천연 항산화성 물질로는 ascorbic acid, tocopherol류 외에 flavonoids와 그 유도체^{23,24)}, 갈변 반응 생성물질^{14,29)}, 아미노산들, 펩티드들^{13,19)}, 단백질^{10,22)}등이 알려져 있다.

이와같이 항산화 효과에 대한 보고는 많

으나 우리나라에서 많이 사용하는 향신료인 겨자에 대한 보고는 없는듯 하여 천연 항산화물질 개발연구에 기초적인 자료를 얻기 위하여 겨자의 메탄올 추출물의 항산화 효과를 조사한바 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

1. 공시재료

본 실험에 사용한 겨자는 재래종으로 수확한지 6개월 된 것을 대구시내 백화점에서 구입하여 건전한 것을 재료로 사용하였으며, 겨자의 일반 성분은 Table1과 같다.

산패도 조사를 위한 기질로서 시판 식용 대두유를 사용하였으며 기름의 과산화물가(Peroxide value), TBA가(2-Thiobarbituric acid value), 요오드가(Iodine value), 검화가(Saponification value)는 Table 2와 같다.

Table 1. Chemical composition of Mustard seed

Moisture	8.3(%)
Ash	5.6
Crude protein	33.7
Crude fat	21.6

Table 2. The result of some chemical analysis of the soybean oil used substrate

Peroxide value(meq/kg oil)	0.3±0.05
TBA value	0.04±0.01
Iodine value	127±1
Saponification value	190±2

2. 실험방법

1) 겨자의 일반성분

겨자의 수분, 단백질, 지방, 회분 등의 일반성분은 A. O. A. C. 방법²⁾에 따라 실시하였다.

즉 수분은 상압건조법, 조단백질은 Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet법, 회분은 550°C에서 직접회화법으로 행하였다.

2) 대두유의 성상

과산화물가는 요오드 적정법인 Lea²¹⁻²²⁾법의 개량법으로 측정하였다.

TBA가는 Sidewell등의 방법²⁶⁾으로 행하였으며 검화가와 요드가는 Pearson²¹⁾과 A. O. A. C-Wijs등의 방법¹⁶⁾에 준하였다.

3) 脱脂겨자粕의 제조

겨자 종자를 Lea방법에 따라 Fig.1과 같이 실시하였다.

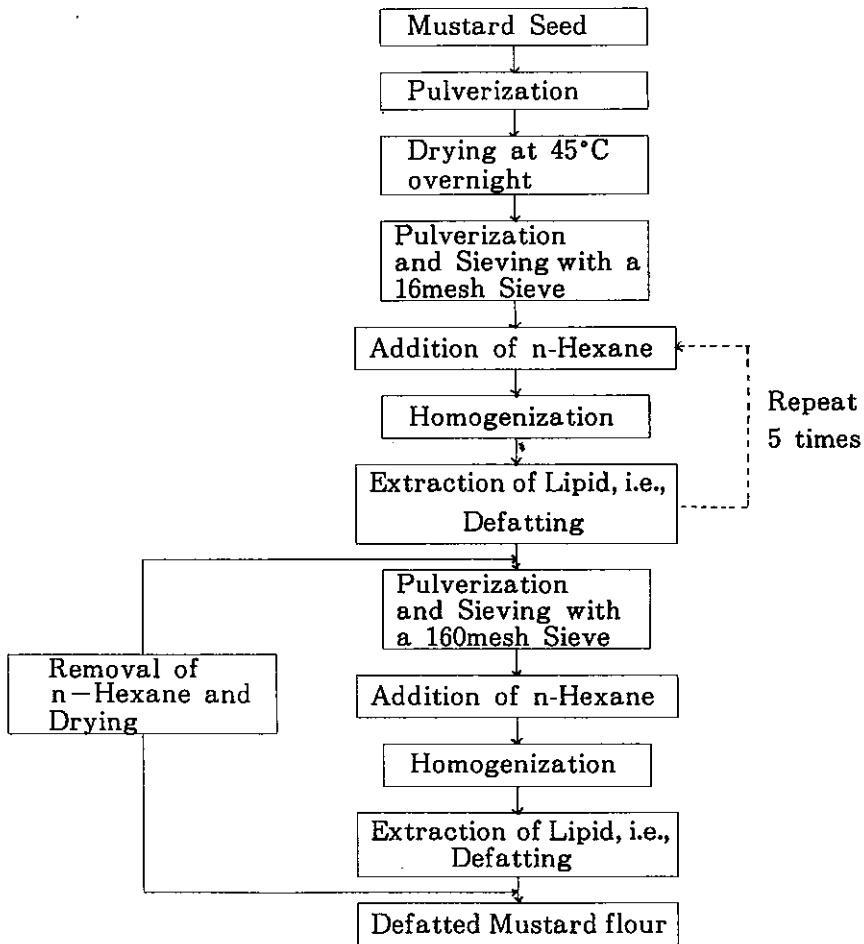


Fig. 1. Preparation of defatted mustard flour.

즉 겨자 종자를 수세·건조한 다음 분쇄·건조하여 n-Hexane으로 반복 추출하여 지질을 제거하였다.

용액과 잔사를 분리한 후 잔사를 상온에서 24시간 풍건한 것을 탈지 시료로 하였다.

4) 유리페놀산 에스터형 및 불용성 페놀산의 추출

페놀물질의 추출은 Kozlowaka¹⁵⁾과 Krygier¹⁶⁾의 방법에 따라 Fig.2와 같이 실시하였다.

즉 50g의 탈지겨자박에 200ml의 Trichloroethylene을 가하여 3분간 homogenizing한 다음 원심분리하여 trichloroethylene을 제거한 후 3번 반복하여 지질을 제거하였다.

얻은 탈지박을 80% 뜨거운 메탄올 200ml로 5번 추출하여 추출액을 200ml로 농축하였다.

이 농축액을 유리페놀산과 에스터형 페놀산의 분석에 사용하였으며 잔사는 불용성 페놀산 추출에 사용하였다.

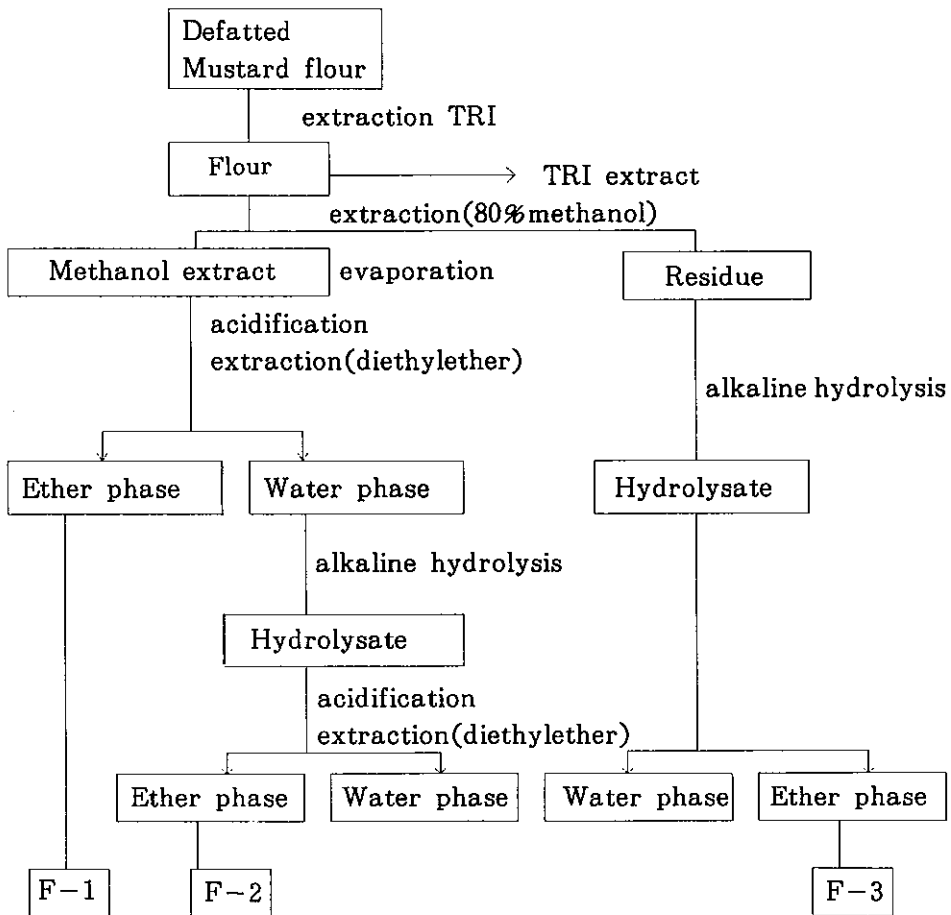


Fig. 2. Procedure for the fraction of free esterified and insoluble phenolic compounds and their hydrolysis to the corresponding phenolic acids.

유리페놀산을 추출하기 위하여 농축액을 1N-HCl로 PH2로 조절한 다음 4,000rpm에서 20분간 원심분리하여 부유물을 제거하였다.

상등액은 같은 분량의 diethylether로 6번 추출하였으며 추출된 diethylether는 Sodium Sulfate anhydrous로 잔여수분을 제거하였다.

유리페놀산을 함유한 diethylether 추출물을 30°C에서 증발시켜 잔사를 메탄올 100ml로 녹였다.

에스터형 페놀산 추출을 위하여 물층을 200ml 2N-NaOH로 가수분해를 위해 질소 충전하에 4시간 실온에 방치한 후 pH2로 하고 4,000rpm에서 20분간 원심분리하였다.

Hydrolysed페놀산은 diethylether로 위와 같은 방법으로 추출 농축하여 잔사를 메탄올 10ml로 녹였다.

불용성 페놀산의 추출을 위하여 뜨거운 메탄올로 추출한 잔사를 직접 200ml 2N-NaOH로 가수분해를 위해 질소 충전하에서 4시간 실온에 방치한 후 산성화시켜 원심분리한 상등액을 diethylether로 위와같은 방법으로 농축하여 잔사를 메탄올 10ml로 녹였다.

5) 추출물의 총 페놀산의 함량측정

총 페놀산의 함량은 Bray와 Thorpe의 방법에 따라 실시하였다.

즉 시험용액 2ml를 2ml의 2% Na_2CO_3 와 혼합 후 0.2ml 50% Folin ciocalteau 시약을 가하여 혼합물을 상온에서 30분간 방치하여 Spectrophotometer(CE303)을 사용하여 750

nm에서 흡광도를 측정하였다.

공시험은 시험용액 대신 0.2ml메탄올을 사용하였으며 표준곡선 작성을 위하여 catechol(동경 화성제)을 표준물질로 사용하였다.

6) 대두유 기질의 조제 및 저장

겨자 탈치박 25g에 준하는 5ml 페놀산 추출물과 0.02% (w/w), BHA, BHT를 대두유 150g에 잘 혼합한 후 용매는 water bath에서 제거하였다.

페놀산과 인공 항산화제가 첨가된 대두유를 3개의 petridish에 균등히 분량하여 $45 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 항온기에서 25일간 저장하였다.

7) 페놀산의 동정

겨자박의 페놀산 동정을 위하여 Katagi 등¹²⁾의 방법에 따라 추출물에 N. O. bis-trimethylsilyl acetamide : acetonitrile(1 : 4v/v) 용액 0.9ml를 가하여 60°C에서 5분간 TMS화시킨 후 그중 2ml를 취하여 GC(Pye Unicam England)로 분석하였다.

각 peak의 동정은 표준물질을 사용하여 실시하였으며 이때 분석조건은 Table3과 같다.

8) 항산화력의 측정

저장기간 동안 5일 간격으로 과산화물가와 TBA가를 측정하여 비교함으로써 항산화 효과를 검토하였다.

과산화물가는 Lea법의 개량법^{2,26)}, TBA가는 Sidewell등의 방법⁴⁾에 따라 실시하였다.

Table 3. The operating conditions of GC used in experiments

Items	Conditions
Column	Chromosorb W5% SE 30, 1.5m×4mm, glass
Temp. program	130°C(2min)···5°C/min ···250°C(14min)
Detector	F. I. D.
Carrier gas	Nitrogen, 30ml/min
Injection temp.	270°C
Detector temp.	280°C
Chart speed	0.25cm/min

결과 및 고찰

1. 페놀산류별 함량을 Table4에 나타낸 바와 같이 용성 에스터형이 가장 많은 함량을 보였고 전체의 95%를 차지함을 알 수 있다.

2. 항산화 효과 비교

1) 과산화물가

저장일수의 경과에 따른 과산화물가 변화를 Fig.3에 나타내었다.

모든 시험구의 과산화물가는 저장기간동안 증가하였으나 전기간동안 대조구 보다는 상당히 낮은 값을 나타내었고 저장기간 10일까지는 완만한 변화를 나타내었으며 15일부터는 불용성 페놀산 추출물, BHA보다는 BHT, 유리 페놀산, 에스터형 페놀산 추출물이 현저한 항산화 효과를 나타내었으며 이중 에스터형은 인공 항산화제 보다 더욱 효과가 높았다.

이는 총 페놀산 함량이 95.2%라는 높은

Table 4. The total contents of phenolic acids in each type of extracts

Phenolic Acid Type	Dilution Ratio	Abs*	Total content (mg/10ml)	Percent Ratio
Free Acids	20	0.262	13.2	3.7
Soluble Ester	200	0.676	340.2	95.7
Insoluble	10	0.083	2.1	0.6
Bound acids				

Abs* : Absorbance at 750nm

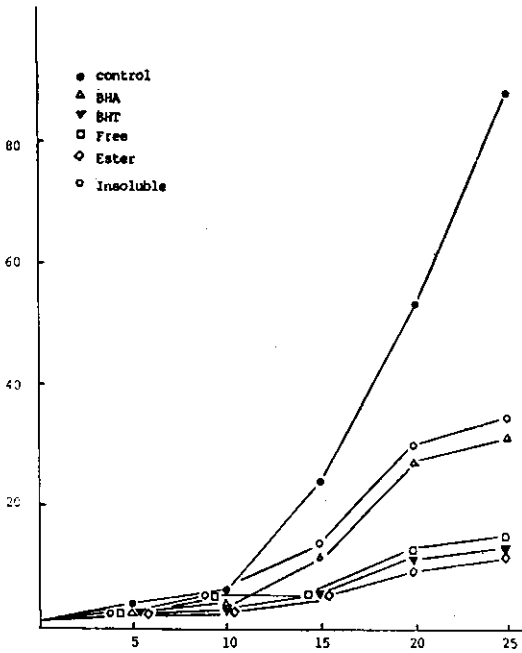


Fig 3. Variation of the peroxide value of the soybean oil substrates containing BHA, BHT and various phenolic acid extracts with storage time.

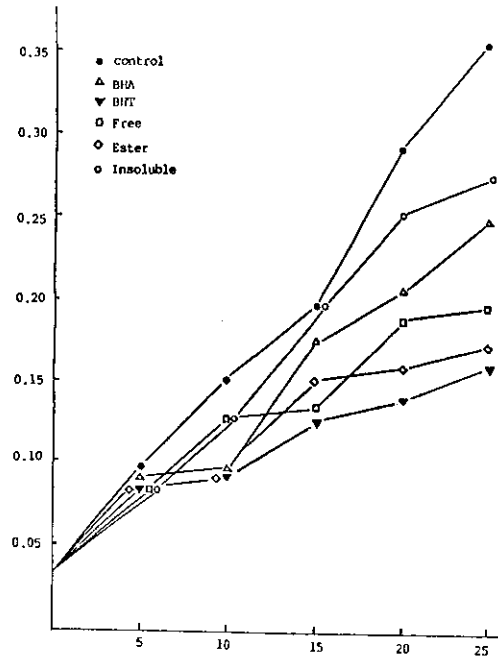


Fig 4. Variation of TBA value of the soybean oil substrates containing BHA, BHT and various Phenolic acid extracts with storage time.

량에 기인한 것으로 보며 이는 들깨¹⁸⁾, 참깨²⁰⁾의 페놀물질의 항산화 효과에서와 비슷한 결과를 나타내었다.

2) TBA가

저장일수 경과에 따른 TBA의 변화는 Fig.4와 같다.

모든 시험구의 TBA는 저장기간 동안 증가하였으나 대조구 보다는 낮은 항산화 효과를 나타내었다.

5일까지는 유사한 증가를 보였으나 그 이후 타 시험구에 비하여 BHT와 에스터형 페놀산 추출물의 시험구는 거의 증가하지 않았으며 10일 이후에도 그 증가는 타에 비하여 완만히 나타났다.

이중 에스터형 페놀산 추출물이 인공 항산화제 못지 않은 효과를 나타내었다.

이와같은 결과는 들깨¹⁸⁾, 참깨²⁰⁾의 페놀물질의 항산화에서와 비슷한 결과를 보였다.

TBA가 과산화물가와의 순서일치가 되지 않는 것은 겨자의 색소와 TBA의 결합이 TBA-malon aldehyde 복합물 형성에 방해가 된 것으로 간주된다.

3) 페놀산의 동정

겨자에 존재하는 주요 페놀 화합물의 종류를 알아보기 위하여 유리페놀산 및 에스터형 페놀산 추출물의 GC chromatogram과 표준품의 GC chromatogram을 Fig. 5, 6, 7에 나타내었다.

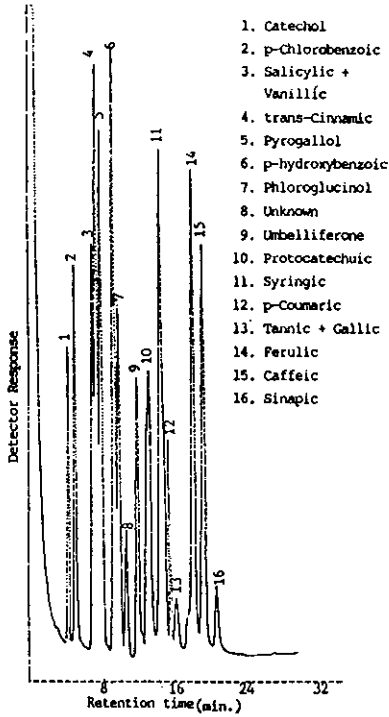


Fig 5. GLC chromatogram of TMS derivatives of phenolic standard(1.5 m X 4mm glass column packed with 5% SE 30 100-120mesh Chromosorb W).

유리페놀산의 추출물에는 catechol, methylcatechol), caffeic acid, sinapic acid를 동정할 수 있었으며 에스터형 페놀산의 추출물에는 methylcatechol, cinnamic acid, pyrogallol, P-hydroxybenzoic acid, syringic acid, gallic acid, caffeic acid, sinapic acid를 동정할 수 있었으며 에스터형 페놀산 추출물에서는 유리페놀산 추출물에서 동정되지 않은 gallic acid, pyrogallol을 동정할 수 있었다.

김등의 보고에 따르면 종자에 널리 분포되어 있는 항산화력이 강한 페놀물질로서는 BHA, PG보다 강한 항산화 효과가 있다고 하였으며 ferulic, p-coumaric, syringic acid 역시 강한 항산화 효과가 있다고 보고하였다.

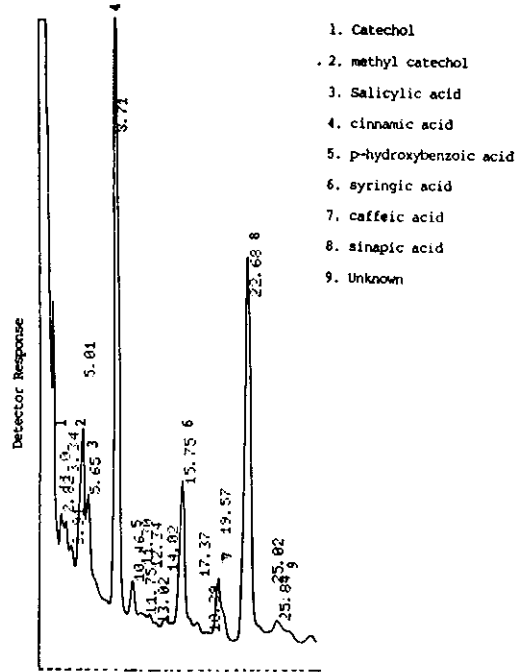


Fig 6. Gas chromatogram of free phenolic acids.

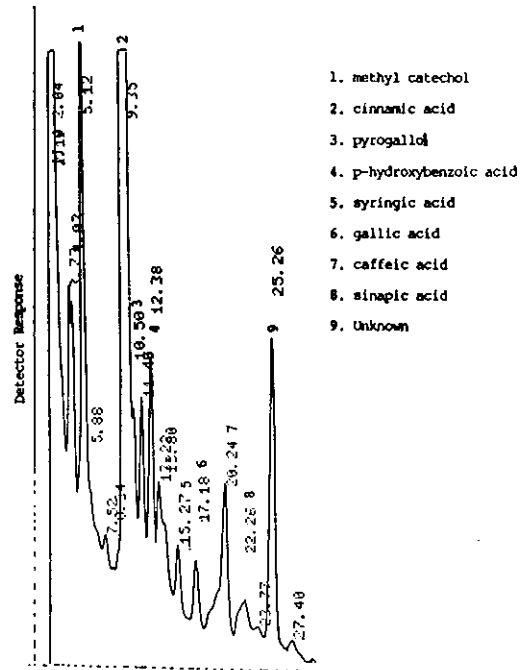


Fig 7. Gas chromatogram of phenolic acids liberated from soluble Ester.

인용문헌

반면에 salicylic, p-hydroxybenzoic, vanillic, cinnamic acid는 약한 항산화 효과가 있다고 보고하였다.

이로 미루어 볼 때 겨자의 페놀화합물의 종류는 항산화 효과가 강한 것이 있을 것으로 사료된다.

적 요

탈지 겨자박으로 부터 유리페놀산, 에스터형 및 불용성페놀산을 추출하여 식용대두유 기질에서 항산화 효과를 0.02%(w/w)의 BHA, BHT의 항산화 효과를 비교하였는바 다음과 같은 결과를 얻었다.

각 기질과 대조구를 $45 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 25일간 저장하면서 매5일간 과산화물가, TBA가를 측정하여 항산화 효과를 추정하였다.

1. BHA, BHT와 유리페놀산, 에스터형 및 불용성페놀산 추출물을 첨가한 시험구와 대조구의 25일 저장 후 과산화물가는 각각 31.9, 13.2, 16.6, 11.2, 35, 91이었다.

한편 같은 조건하에서 각 항산화성 물질의 TBA가는 0.24, 0.16, 0.19, 0.17, 0.35이었다.

이로 미루어 볼 때 페놀산 추출물들은 식용대두유 기질에서 우수한 항산화 효과를 나타내었다.

2. 겨자의 총 페놀함량은 유리페놀산 및 불용성페놀산의 추출물이 각각 13.2mg/10ml, 340.5mg/10ml, 2.1mg/10ml였다.

3. 분리 동정된 페놀산은 catechol, methylcatechol, salicylic acid, cinnamic acid, pyrogallol, p-hydroxybenzoic acid, syringic acid, caffeic acid, sinapic acid였다.

1. Allen, J. R. and Engblom, IF.(1972) Food Cosmet. Toxicol. 10,769
2. A. O. A. C.(1970) Association Official Analytical Chemists., Washington D. C.
3. Bishov, S. J., Masuoka, Y. and Kapsalis, J.G.(1977) J. Food Processing and Preservation. 1,153.
4. Broman, A. L.(1975) J. Am. Oil Chem. Soc. 52,59.
5. Chang, S. S., Matijasevic, B. D., Hsieh, O. A. L. and Huang, C. h.(1977) J. Food Sci. 29, 27.
6. Chipault, J. R., Mizuno, G. R. and Lundberg, W. O.(1956) Food Tech. 10, 209.
7. 한국식품 과학회지 (1981) Vol. 13., No. 4.
8. Hideharu, F., Takai, Y. and Iwo, H. (1974) Eiyojaku Zasshi. 32(1), 1.
9. Johnson, A. B. and Hewgil, F. B.(1961) Aust. Exp. Biol. Med. Sci. 39, 353.
10. Kajimoto, G. and Kamo, K.(1964) Etyo To Shokyro. 16,510.
11. Karel, M., Tannenbaum S. R., Wallane, D. H. and Malong, H.(1966) J. Food Sci. 31,892.
12. Katagi, T., Horii, A. and M. Makita. (1973) Gas Chromatography of favonoids, J. Chromatography. 79 : 45~56.
13. Kihara, Y. and Inoue, T.(1962) Nippon Shikunin kogyo Carkaishi. 9,290.
14. Kirigaya, N, Kato, H. and Fujinaki, M.(1968) Agri. Chem. Soc.(Japan). 43, 484.

15. Koziouaka, H., Rotkiewice, D. A., Zader-nouski, R. and Sosulski, F. W.(1983) J. Am. Oil Chem. Soc. 60(6), 1119.
16. Krygia, K., Sosulski, F. and Hogge (1982) J. Agric. Food Chem. 30(2), 330.
17. Lea, C. H.(1949) Peroxide number-Cold method. J. Am. Oil Chem. Soc. 26, 152.
18. Lee, K. Y.(1983) Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Isolated form Deffatted Perilla Seed flour, Department of Food Tech., Korea Univ.
19. Lim, D. and Shipe, W. F.(1972) J. Dairy Science. 55,753.
20. Marcuse, R.(1960) Nature 183,836.
21. Pearson, D.(1976) The Chemical Analysis of Food 7th Churchill Linning stone. Louden, P.491.
22. Pokony, J., Janicek, G. and Vasakova, M.(1961) Sb, Vysoke Scolg Chem. Tech. Prare. Potravinarska Tech. 5,616.
23. Pratt, D. E. and Watts, B. M.(1964) J. Food Sci. 29, 27.
24. Pratt, D. E.(1972) J. Food Sci. 37,322.
25. Saito, Y., Kimura, Y. and Sakamoto. T.(1976) Eiyojaku to Shokuryo. 29,505.
26. 小源哲二郎等(1975) 食品分析 建帛社. 146 ~159.
27. Surak. J. G., Bradley, R. L., Branen. A. L. and Shrago, E.(1976) Food Cosmet. Toxicol. 14,227.
28. Thesis for the Degree of Master.(1984) Dept. of Food Tech., Korea Univ. .
29. Yamaguchi, N. and Koyama, Y.(1967) J. Food Sci. and Tech.(Japan) 14,106.