

지방산의 酸化에 대한 양조간장의 抗酸化 특성

최홍식·이정수·문갑순*·박건영

부산대학교 식품영양학과, *인제대학교 식품영양학과

Antioxidative Characteristics of Fermented Soybean Sauce on the Oxidation of Fatty Acid Mixture

Hong-Sik Cheigh, Jeong-Soo Lee, Gap-Soon Moon* and Kun-Young Park

Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan

*Department of Food and Nutrition, Inje University, Kimhae

Abstract

Antioxidative characteristics of freeze dried soybean sauce powder (SSP) on the oxidation reaction of linoleic acid mixture(LA) were evaluated by the determinations of peroxide formation, synergistic property, hydrogen donation and lipoxxygenase activity. SSP was found to possess a considerable potentiality of antioxidant activity on the formation of hydroperoxides in the LA oxidation reaction system at 50°C for 144 hrs. This antioxidative effect was increased by the concentration from 0.02% to 0.5% of SSP in the reaction system. Under the condition of presence of ferric chloride (10 ppm) in the reaction system, appreciable effect of SSP on the synergistic antioxidation were observed. On the other hand, hydrogen donation property of SSP onto α , α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl was found and inhibitory ability of SSP on LA oxidation was also shown in the reaction system of lipoxxygenase-catalized oxidation.

Key words: fermented soybean sauce, antioxidant, fatty acid, linoleic acid, lipid oxidation, lipoxxygenase

서 론

양조간장은 加熱牛肉의 지방질 酸化에 강한 항산화 특성이 있으며 모델시스템에 있어서 그 효과는 양조간장의 숙성기간이 길수록 또 농도가 높을수록 유의적인 정적 상관관계를 보였음은 이미 前報에서 보고한 바와 같다^(1,2). 그리고 양조간장의 항산화 효과와 관련된 주요원인 물질로는 아미노산, 페놀물질 및 갈색물질 등으로 추정된 바 있다⁽²⁾. 이들 물질들은 양조간장의 발효숙성 과정 중 원료 단백질과 탄수화물 등의 분해에 의하여 생성된 성분들이거나 원료 대두 및 소맥에서 용출된 페놀화합물들 그리고 마이아르반응 등에 의하여 형성된 멜라노이딘 성분들이라고 사료된다⁽³⁻⁶⁾.

오늘날 합성항산화제의 안전성에 대한 의문이 제기되면서 천연항산화물질에 대한 관심이 고조되고 있는 바, 양조간장의 항산화 작용은 양조간장이 지니는 조미식품

외의 중요한 기능적 특성이라는 점에서 큰 의의가 있다고 생각된다.

본 연구는 우육지방질의 산화 양상에 미치는 양조간장의 항산화 작용에 관한 이전의 연구에^(1,2) 이어, 리놀레산 등의 지방산 산화에 대한 양조간장의 항산화 특성과 기존 항산화제 및 상승제와의 항산화력 비교 그리고 리폭시게나아제에 미치는 영향 등을 검토한 것으로, 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료의 조제 및 시약

양조간장은 전보⁽²⁾에 따라 6개월간 숙성시켜 제조한 것으로서 함유 조단백질은 7.2% (N×6, 25), 조회분은 16.7% 그리고 총고형물은 28.5%이었다. 이를 동결온도 -40°C에서 급속동결시킨 후 수분함량 3% 이하로 동결건조(Virtis Bench Top III, Virtis Co., Ltd, USA, 조건: 진공도 100mili torr 내외, 온도 -20°C 이하)시킨 다음 질소개스를 치환한 용기에 밀봉한 상태

Corresponding author: Hong-Sik Cheigh, Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, 30, Jangjun-dong, Keumjung-ku, Pusan, 609-735

로 하여 냉동고(-18°C)에 저장하면서 실험에 사용하였다. 그리고 산화반응에 사용된 지방산은 리놀레산 혼합물(linoleic acid mixture, Fluka Co., Switzerland)이며 이전에 보고한 방법⁽⁷⁾에 따라 지방산 조성을 분석해본 결과 Table 1과 같이 리놀레산이 64.6% 그리고 올레산이 27.4%이었다. 그리고 알파-토코페롤, 부틸화히드록시안니솔(BHA) 및 리폭시게나아제(Soybean type 1-S) 등은 Sigma Chemical Co. (USA)의 것을, 기타는 시약 특급의 것을 사용하였다.

산화반응의 조건 및 과산화물가 분석방법

삼각플라스크(100 ml)에 지방산(리놀레산 혼합물) 1.00g을 정칭하여 주입한 후 에탄올 20 ml을 가해 이를 녹이고, 인산완충용액(0.2 M, pH 7.0) 25 ml을 가하여 혼합하였다. 그리고 이 때 첨가하는 항산화물질은 그 용해성에 따라 에탄올 또는 인산완충용액에 용해시켜 해당 농도로 만든 다음 그 1 ml을 여기에 첨가하였다. 그 다음 50°C에서 해당 반응시간 동안 자동산화시킨 후 통상의 방법에 따라 과산화물값을 분석하였다⁽⁸⁾.

수소공여성 및 리폭시게나아제 활성저해도 측정

수소공여성은 DPPH (α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl)법⁽⁹⁾에 의하였고 리폭시게나아제의 활성은 기존의 방법^(10,11)을 보완하여 다음과 같이 실시하였다. 먼저 해당 항산화물질용액, 기질원액 및 효소용액을 만들되, 기질원액은 0.1 ml 에탄올에 0.17 μ l의 리놀레산을 녹이고 여기에 0.17 M의 붕산완충용액 1 ml의 비율로 혼합하고 pH 9.0으로 조정한 후 균질화시켜 조제하였고, 효소용액은 효소표준품(52,000 unit/mg solid)과 리놀레산의 무게비가 1 : 30이 되도록 조정하여 0.17 M 붕산

완충용액에 녹여 만들었다. 그리고 리폭시게나아제의 활성과 그 저해도 실험은 해당 항산화물질용액 0.1 ml와 효소용액 0.9 ml를 잘 혼합한 후 25°C를 유지하는 항온수조에서 먼저 예비반응 시켰다. 다음, 여기에 기질원액 2 ml를 가하여 다시 25°C에서 반응시키면서 일정시간 간격으로 분광광도계(Cecil CE 599, England)에서 흡광도(238 nm)를 측정하였으며, 그 값의 증가를 기록하도록 하였다.

결과 및 고찰

지방산의 산화과정에 미치는 영향

양조간장이 지방산의 자동산화반응에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 그 분말을 0.02, 0.05, 0.10% 수준의 농도로 리놀레산 혼합물에 첨가하여 50°C에서 산화반응을 시키면서 과산화물가의 변화를 살펴본 결과 Fig. 1과 같다. 반응시간의 경과에 따라 산화는 급격히 진행되어 양조간장을 첨가하지 않은 대조구의 경우 반응 96시간에 1500 이상의 과산화물가를 보이다가 그 이후 분해 또는 2차반응 등에 의하여 크게 감소하는 경향을 보였다. 그

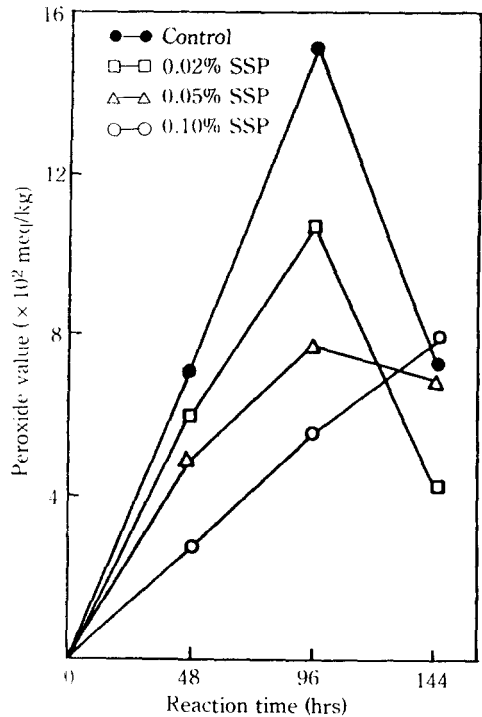


Fig. 1. Changes of peroxide values of linoleic acid mixture with the addition of soybean sauce power (SSP) during oxidation reaction at 50°C

Table 1. Fatty acid composition of linoleic acid mixture used for reaction

Fatty acid	%
12:0	0.1
14:0	0.3
16:0	5.0
18:0	1.4
18:1	27.4
18:2	64.6
18:3	0.5
20:1	0.1
20:2	0.1
20:3	0.2
20:4	0.2

리고 양조간장 첨가구의 경우는 모두 과산화물의 생성에 영향을 주었고 그 농도가 높을 수록 항산화 경향이 높은 결과를 보였다. 이러한 사실은 간장이 육류지방질의 산화에 강한 항산화 특성을 보였던 결과와^(1,2) 유사하게 유리지방산-수용액 시스템에서도 같은 경향을 나타낸다고 할 수 있었다. 그리고 지방산에 대한 항산화 특성은 산화반응의 지연효과와 과산화물 생성량의 억제효과를 함께 지니는 결과를 나타내고 있었다. 이와 같은 항산화 특성은 대두 또는 그 제품에서 함유하고 있는 폴리페놀 화합물 특히, isoflavones, chlorogenic acid isomers, caffeic acid에 의할 수 있고^(5,6) 이러한 물질이 발효과정 중에 글루코시드 등으로부터 유리되어 나오기 때문이라고 사료된다⁽¹²⁾. 그러나 이러한 항산화성은 발효과정 중에 형성된 갈변물질에 의하여 더 강하게 일어날 수 있으며^(2,3) 여러 가지 종류의 인지방질, 토코페롤, 아미노산, 펩티드 등도 함께 기여할 것으로 판단된다⁽¹³⁾.

기존 항산화제 및 상승제와의 비교

양조간장의 항산화 특성을 이미 잘 알려진 항산화제인 알파-토코페롤 및 BHA와 함께 과산화물가 비교 실험을 행한 결과 Table 2와 같다. 먼저 알파-토코페롤 0.05% 첨가수준의 항산화성은 양조간장 분말의 경우 0.2~0.5% 범위에 있었으며, 이와 비교하면 BHA는 거의 완전한 항산화 효과를 보였다. 이러한 결과는 비록 양조간장 분말이 BHA와 같이 미량으로서 그 효과를 기대할 수는 없으나, 그 자체는 조미식품의 하나로서 사용되고 있으므로 비교적 많은 양을 첨가할 수 있으며 따라서 여러가지 종류의 식품계 내에서 천연항산화제로서의 다양한 활용이 기대된다.

Table 2. Peroxide values of linoleic acid mixture (LA) with the addition of soybean sauce powder (SSP), α -tocopherol (TH) and butylated hydroxy anisol (BHA) during oxidation reaction at 50 °C for 24 hrs and 48hrs

Treatments	Peroxide value (meq/kg)	
	24 hrs	48 hrs
LA(Control)	183 ± 15 ^{a)}	663 ± 42
LA + 0.1% SSP	134 ± 19	311 ± 34
LA + 0.2% SSP	56 ± 8	153 ± 22
LA + 0.5% SSP	25 ± 6	58 ± 11
LA + 0.05% TH	27 ± 5	103 ± 18
LA + 0.05% BHA	0.8 ± 0.5	1.4 ± 0.9

^{a)} Mean ± standard deviation

한편, 산화를 촉진하는 미량금속 물질이 존재할 때 그리고 구연산과 같은 효과상승제와 공존할 때의 지방산 산화에 미치는 양조간장의 영향에 대하여 살펴본 결과 Table 3과 같다. 즉, 10 ppm의 염화제일철이 함유된 리놀레산 혼합물의 과산화물가는 198(24시간) 및 830(48시간)을 보였으나 여기에 0.2% 농도로 양조간장 분말을 첨가하였을 때는 68 및 328로 현저히 감소되었으며, 이는 0.01% 수준의 구연산을 첨가하였을 때 보다 더 낮은 값을 보였다. 그리고 산화촉진 미량금속이 존재하지 않으면서 구연산과 양조간장이 공존할 때 역시 낮은 값을 보였다. 이와 같은 양조간장의 과산화물 생성억제 효과는 산화촉진 미량 금속의 킬레이트화반응 또는 산화된 일차 항산화 물질의 재생 등으로 설명될 수 있으나 그 메카니즘은 불명확하며 앞으로 규명되어야 할 과제라고 생각된다.

수소공여성

양조간장의 oxidative free radical과의 반응성에 의한 수소공여성을 DPPH법에 의하여 살펴본 결과 Fig. 2와 같다. 0.05% 양조간장 분말용액은 30분간 반응 전 기간에 걸쳐 미미하지만 직선적인 감소경향을 보였으나 수소공여성은 극히 낮은 현상을 나타내고 있었다. 그러나 0.50% 수준의 경우 반응 초기에 수소공여성이 크게 나타나고 있으며 반응시간 경과와 함께 서서히 낮아지다가 후기에서는 거의 나타나지 않았다. 반면에 알파-토코페롤(0.01%)은 반응 개시와 함께 강한 수소공여성을 보였으며 그 정도는 간장분말 0.50% 수준보다도 더 현저하였으나 초기 이후에는 거의 공여성이 나타나고 있지 않았다. 수소공여성은 항산화 특성의 중요한 요인인 oxidative free radical과의 반응성에 기초를 둔 것으로 아미노산, 토코페롤, BHA, 갈변물질 등 여러 가지

Table 3. Peroxide values of linoleic acid mixture (LA) with the addition of soybean sauce powder (SSP), citric acid (CA) and ferric chloride (FC) during oxidation reaction at 50 °C for 24 hrs and 48 hrs

Treatments	Peroxide value (meq/kg)	
	24 hrs	48 hrs
LA (Control)	167 ± 20 ^{a)}	670 ± 37
LA + 10 ppm FC	198 ± 28	830 ± 65
LA + 10 ppm FC + 0.2% SSP	68 ± 17	328 ± 38
LA + 10 ppm FC + 0.01% CA	97 ± 21	384 ± 35
LA + 0.2% SSP + 0.01% CA	34 ± 8	165 ± 22

^{a)} Mean ± standard deviation

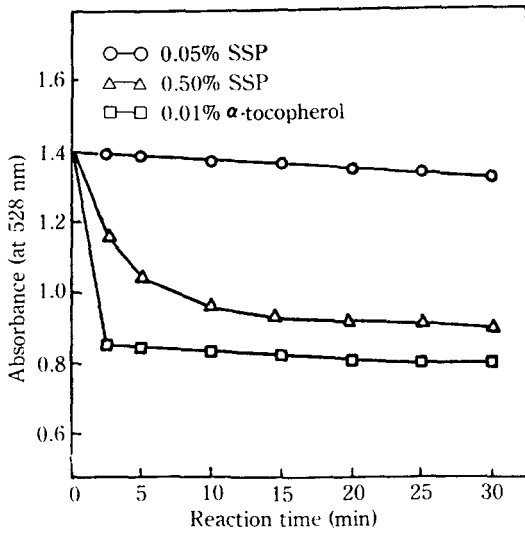


Fig. 2. Effect of soybean sauce powder (SSP) on the absorbance changes of α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH)

항산화물질에 대한 결과가 보고되어 있으며 각각 특색있는 결과를 나타내고 있다^(9,14).

효소촉매적 산화반응에 미치는 영향

리놀레산의 산화를 촉매하는 리폭시게나아제의 존재하에서, 리놀레산 혼합물의 효소촉매적 산화반응에 미치는 양조간장의 영향을 살펴본 결과 Fig. 3과 같다. 양조간장이 함유되지 않은 대조구는 효소활성에 의한 산화반응의 진행으로 conjugated dienoic acid의 증가현상이 급격하게 일어났으나, 양조간장 분말 첨가구는 효소활성 또는 산화반응 체계에 영향을 줌으로써 상대적으로 산화반응이 감소되는 경향을 보였다. 그리고 5.0 mg/ml 보다 1.0 mg/ml 농도에서 더욱 큰 활성저해 또는 산화반응 억제효과를 보이고 있는 것은 대단히 흥미로운 사실이라고 사료되었다. 효소활성 저해는 전자 또는 수소유리기를 제거함으로써 결국 효소의 산화개시 능력을 감소시킨다고 한 바 있으나⁽¹³⁾, 양조간장의 경우는 앞으로 더 규명해 보아야 할 과제라고 생각되었다. 그리고 리폭시게나아제의 활성저해제로 작용하는 항산화제로는 이미 BHA, 알파-토코페롤, 아스코르브산, 푸로필갈레이트 등 여러가지 종류들이 보고된 바 있다^(10,14).

요 약

리놀레산이 함유된 액상 모델시스템에 있어서 지방산

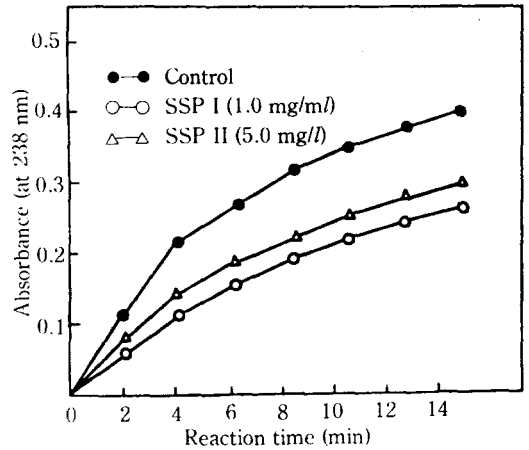


Fig. 3. Effect of soybean sauce powder (SSP) on the lipoxigenase catalyzed oxidation reaction of linoleic acid mixture

의 산화반응에 미치는 양조간장(분말)의 항산화 특성에 대한 일련의 연구를 행하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 양조간장은 산화반응 과정 중 과산화물 생성을 억제하였으며 반응에 첨가된 양조간장의 함량이 높을 수록 항산화 작용이 더 큰 결과를 보였다. 이를 기존 항산화제와 비교하였을 때 알파-토코페롤 0.05% 첨가수준의 항산화성은 양조간장 분말 0.2~0.5% 범위에 있었다. 그리고 10 ppm의 염화제일철이 함유된 산화반응에 있어서 양조간장은 미량금속의 산화촉진작용을 저하시켰으며 구연산과 공존할 때 항산화작용의 상승효과도 있었다. 또한, 양조간장은 oxidative free radical과 반응하였을 때 수소공여성이 인정되었으며 리놀레산 혼합물의 리폭시게나아제 촉매적 산화반응을 억제하는 효과도 보였다.

감사의 말

본 연구는 1988-1989년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 이루어진 결과의 일부이며 이에 감사사를 드린다.

문 헌

1. 문갑순, 최홍식: 牛肉 지방질의 酸化에 미치는 간장의 항산화 작용에 관한 연구, 한국식품과학회지, 18, 313(1986)
2. 문갑순, 최홍식: 양조간장의 항산화 작용 및 항산화성 물질에 관한 연구, 한국식품과학회지, 19, 537(1987)

3. Motai, H. and Inoue, S.: Oxidative browning in color of shoyu, *J. Japanese Agr. Chem. Society*, **48**, 329(1974)
4. Pratt, D.E.: Water soluble antioxidant activity in soybeans, *J. Food Sci.*, **37**, 322(1972)
5. 최홍식 : 간장의 風味 성분 및 安全性 관련 성분, 한국간장에 관한 심포지움, 韓國農化學會 영남지부, 29(1988)
6. Pratt, D.E. and Birac, P.M.: Source of antioxidant activity of soybeans and soy products, *J. Food Sci.*, **44**, 1720(1979)
7. 김혜경, 김복남, 최홍식 : 쉐보리 결합지질의 추출과 그 조성에 관한 연구, 한국영양식량학회지, **18**, 109(1989)
8. Hayase, F. and Kato, H.: Antioxidative components of sweet potatoes, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **30**, 37(1984)
9. 김상달, 도재호, 오훈일 : 고려인삼 갈변물질의 항산화 효과, 韓國農化學會誌, **24**, 161(1981)
10. Rogstad, A. and Reinton R.: A gas chromatographic method for testing antioxidants, *J. Amer. Oil Chem. Society*, **54**, 282(1977)
11. Surrey, K.: Spectrophotometric method for determination of lipoxygenase activity, *Plant Physiol.*, **39**, 65(1963)
12. Murakami, H., Asakawa, T., Terao, J. and Matsu-shita, S.: Antioxidative stability of tempeh and liberation of isoflavones by fermentation, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2971(1984)
13. Reinton, R. and Rogstad, A.: Antioxidant activity of tocopherols and ascorbic acid, *J. Food Sci.*, **46**, 970(1981)
14. 이정수 : 양조간장에서 분리한 갈색물질의 항산화성에 관한 연구, 부산대학교 석사학위논문(1989)

(1990년 3월 29일 접수)