

양조간장에서 분리한 멜라노이드인 관련물질의 항산화 작용 특성

최홍식[†] · 이정수 · 이창용*

부산대학교 식품영양학과

* 코넬대학교 식품과학 및 공학과

Antioxidative Characteristics of Melanoidin Related Products Fractionated from Fermented Soybean Sauce

Hong-Sik Cheigh[†], Jeong-Soo Lee and Chang-Y. Lee*

Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, Cornell University, Geneva, NY, 14456, USA

Abstract

Antioxidative characteristics of melanoidin related products (MRPs) fractionated from fermented soybean sauce were studied during the oxidation process of model systems. MRPs were prepared from soybean sauce fermented for 6 months after inoculation *Aspergillus oryzae* by the fractionation through the Sephadex G-10 column and the freeze drying of collected fractions. MRPs inhibited the formation of peroxides during the oxidation of linoleic acids mixture in ethanolic phosphate buffer solution at 50° C with the increasing tendency by their concentration in reaction systems. MRPs had hydrogen doner properties during the reaction with α , α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl and also MRPs inhibited the iron and lipoxygenase catalytic oxidation. MRPs were found to be fairly stable with no loss of antioxidative effect after storage at 50° C for 15days.

Key words : soybean sauce, melanoidin related products, antioxidative effect

서 론

양조간장은 전통적인 발효 조미 식품으로 대두와 소맥의 원료에서 유래된 각종 단백질, 펩티드, 아미노산, 페놀물질, 당들이 함유되어 있다. 그리고 발효 숙성기간 중 이들 향미성분외에 독특한 흑갈색의 색소를 형성한다¹⁾.

양조간장의 색깔을 이루는 가장 중요한 반응으로서 는 간장제조 중에 일어나는 maillard 반응을 기본적으로 하는 비효소적 갈변반응이다. 일찌기 간장의 색깔이 melanoidin이라고 하였고, 이는 주로 비효소적 갈 변임을 밝혔으며, 특히 효소적 갈변에 관여하는 효소인 tyrosinase 활성이 극히 낮은 조건에서 실험을 행하여 갈변 전구체로서 3-deoxyglucosone의 존재를 확인한 바 있다. 그러므로 간장의 갈색물질은 주로 당-아미노산(혹은 펩티드, 단백질)에 의한 maillard 반응에 의

하며, 또한 melanoidin을 간장에서 직접 분리 확인한 바 있었다^{1,2)}.

전보에 의하면 양조간장 농축액(50%)을 겔 여과 크로마토그래피에 의해 분획한 후, 갈색도가 가장 높은 획분을 모아 동결건조 시킨 후, 항산화 효과를 비교 고찰한 결과, 이 획분은 동일한 농도에서 양조간장보다 항산화 효과가 크며 항산화성 물질을 첨가하지 않은 대조구와는 현저한 차를 나타내었으며, 또한 첨가수준 증가에 따라 과산화물 저해효과의 증가, 지방산의 초기 산패의 속도인 conjugated dienoic acid 생성을 억제하는 경향을 보고 하였다^{2,3)}. 이와 같은 양조간장의 색을 형성하는 주체인 maillard reaction으로부터 형성된 산물인 melanoidin related products (MRPs)은 천연 항산화제 유형으로 식품 위생학적인 면에서 큰 의미가 있다고 사료된다.

본 연구에서는 양조간장에서 MRPs를 분리하여 이의 free radical scavenger 기능, 항산화 효력 상승제의

[†]To whom all correspondence should be addressed

기능과 금속 킬레이터로서의 역할, 대두 리폭시게나아제에 미치는 영향, 저장 안정성 등을 검토한 것으로 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료의 조제 및 시약

양조간장 및 그 분말의 조제는 전보²⁾에 의하며, 양조간장의 갈색물질의 분리는 Sephadex G-10 (Sigma Chemical Co., USA)을 하룻밤 동안 물에 평형시켜 칼럼(2.5×50cm)에 충전시킨 후, 동결건조 양조간장을 50% 용액으로 조제한 다음 이것을 0.5ml씩 column bed 윗 부분에 주입시켜 증류수로 유출시켰다. 유출속도는 2.5ml/min이며 3.5ml씩 분취하였다. 각각의획분은 갈색도를 측정하여 갈색도가 높은 획분을 모아 동결건조시켜 melanoidin related products (MRPs)로 하였다^{3,4)}. MRPs는 질소가스를 치환한 용기에 밀봉한 상태로 하여 냉동고(-18°C)에 저장하면서 실험에 사용하였다⁴⁾.

또한, 산화반응에 사용된 지방산은 리놀레산 혼합물 (linoleic acid mixture, Fluka Co., Switzerland)이며 이전에 보고한 방법⁵⁾에 따라 지방산 조성을 분석한 결과 주성분인 리놀레산이 64.6%이며 올레산이 27.4%로 기타 지방산들은 미미하게 함유되어 있었다. 그리고, 리폭시게나아제의 기질로 사용된 리놀레산(99% 함유), α -토코페롤, 리폭시게나아제 (Soybean type 1-5) 및 DPPH (α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl) 등은 Sigma Chemical Co.(USA)의 것을, 기타 시약은 특급의 것을 사용하였다.

갈색도, 산화방법 및 과산화물가의 측정

갈색도는 분광광도계(Bausch & Lomb spectronic 88, USA)를 사용하여 420nm에서 흡광도를 측정²⁾하였으며, 산화방법은 전보²⁾와 같고 과산화물가의 분석은 Hayase와 Kato의 방법⁵⁾에 따라 분석하였다.

Free radical scavenger로서의 능력 및 Synergistic effect의 측정

Free radical scavenger 능력은 DPPH법에 의하였고⁶⁾, synergistic effect의 측정은 리놀레산 혼합물에 "MRPs + 0.01% 구연산" 또는 "MRPs + 2ppm 엽화제 일철"을 첨가하여 앞의 산화방법⁵⁾에 따라 산화시킨 후 과산화물가를 분석하였다.

리폭시게나아제 활성 저해도의 측정

리폭시게나아제의 활성은 기존의 방법을 보완하여 다음과 같이 실시하였다⁷⁾. 먼저 해당 항산화 물질용액, 기질원액 및 효소용액을 만드는 데 있어 기질원액은 0.1ml 에탄올에 0.17 μ l의 리놀레산을 녹이고 여기에 0.17M의 붕산완충용액 1ml의 비율로 혼합하고 pH 9.0으로 조정된 후, 균질화시켜 조정하였고 효소용액은 효소 표준품(52,000unit/mg solid)과 리놀레산의 무게비가 1 : 30이 되도록 조정하여 0.17M 붕산완충용액을 녹여 만들었다. 그리고 리폭시게나아제의 활성과 그 저해도 실험은 해당 항산화 물질용액 0.1ml와 효소원액 0.9ml를 잘 혼합한 후, 25°C 유지하는 항온수조에서 먼저 예비반응을 시켰다. 다음, 여기에 기질원액 2ml를 가하여 다시 25°C에서 반응시키면서 일정시간 간격으로 분광광도계 (Cecil CE 599, England)에서 흡광도(238nm)를 측정하였으며 그 값의 증가를 기록하였다.

결과 및 고찰

갈색도에 따른 항산화력 비교

양조간장 농축액(50%)을 Sephadex G-10에 의해 분획한 후, 갈색도가 가장 높은 획분을 모아 동결건조시켜 조제한 melanoidin related products (MRPs)을 0.02~0.50% 농도수준으로 하여 갈색도에 따른 과산화물가를 살펴본 결과, Table 1과 같다. 갈색도의 증가(혹은 농도의 증가)에 따라 과산화물가가 현저히 저하되고 있다. 그리고 대조구인 0.05% α -토코페롤의 과산화물가도 측정되었는데 그 값은 MRPs 첨가수준 0.01%와 0.50% 사이의 과산화물 생성수준을 나타내었다. α -토코페롤과 같은 페놀 항산화제는 초기에 생성된 유리기를 안정화시키며, 연쇄반응의 개시를 지연하는 작용을 하는 것으로 보고된 바 있다⁸⁾. MRPs의 경우, 첨가농도의 증가에 따라 과산화물의 생성이 상당히 억제됨이 관찰되었는데, 이 결과는 고분자물질인 melanoidin에서 항산화력이 강하게 나타난다는 이전의 보고와 일치하는 경향을 보여주었다⁹⁾.

Free radical scavenger 기능

MRPs의 oxidative free radical scavenger 기능을 DPPH법에 따라 살펴본 결과 Fig. 1과 같다. 0.01% MRPs는 30분간 반응 전 기간 동안 미미한 free radical scavenger 기능을 나타내고 있었으며, 0.05% MRPs의

경우는 0.01% MRPs와 비교시 흡광도의 차가 약 0.1 (30분 경과)로 나타났으나 큰 차이는 아니었다. 그러나 0.5% MRPs는 반응 초기에 매우 높은 free radical scavenger 기능을 나타내었고 반응시간이 경과함에 따라 서도 유의적인 반응을 보였다. 이와같은 melanoidin의 기능은 glucose-lysine melanoidins 등의 ESR 연구¹⁰⁾에서도 melanoidins가 radical scavenger로써 확인된 바 있었다.

한편, 이 실험구의 대조구인 α -토코페롤은 반응 초기에 0.5% MRPs와 거의 동일한 free radical scavenger 기능을 나타내나, 반응 시간 경과에 따라 free radical과

의 반응성을 나타내지 않았다. Free radical scavenger 기능은 중요한 항산화 특성 요인의 하나이며 DPPH는 free radical로 항산화제와 반응시키므로써 항산화제의 free radical scavenger 능력을 측정할 수 있다⁶⁾. 이와같은 MRPs의 특성은 reductone구조에 의한 것으로 추정되며, 앞으로 free radical scavenger로써의 작용 메커니즘은 규명해야 할 과제라고 사료된다.

Synergistic effect

50°C, 48시간 동안 리놀레산 혼합물의 자동 산화반응에 있어서 "MRPs + 구연산 첨가구"는 MRPs 단독 점

Table 1. Effect of melanoidin related products(MRPs) fractionated from fermented soybean sauce on the formation of peroxide during the oxidation of linoleic acid mixture at 50°C for 48hrs^{a)}

	Concentration (%) of MRPs or α -tocopherol	Peroxide value (meq/kg)	Color intensity ^{c)} (Absorbance at 420nm)
MRPs	No addition	710 ^{b)}	0.00 ^{b)}
	0.02	491	0.085
	0.05	266	0.213
	0.10	194	Not determined
	0.50	48	Not determined
α -Tocopherol	0.05	125	Not determined

^{a)}MRPs were a freeze dried powder from soybean sauce, and were fractionated by the process of Sephadex G column separation and freeze drying method from soybean sauce fermented 6 months after inoculation of *Aspergillus oryzae*. Linoleic acid mixture for reaction system was consisted of linoleic acid (64.6%), oleic acid (27.3%) and other fatty acids, in ethanolic phosphate buffer solution (pH 7.0)

^{b)}Mean of three determinations

^{c)}Color intensity are expressed as absorbance (at 420nm) of respective concentration in distilled water

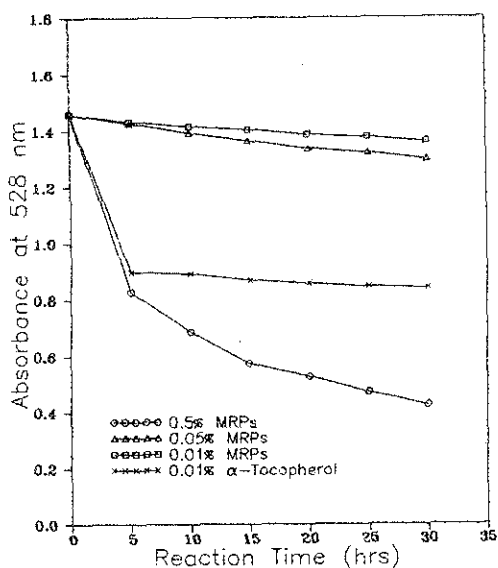


Fig. 1. Absorbance changes by the hydrogen donor properties of soybean sauce melanoidin related products (MRPs) and α -tocopherol during the reaction with α , α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl(DPPH).

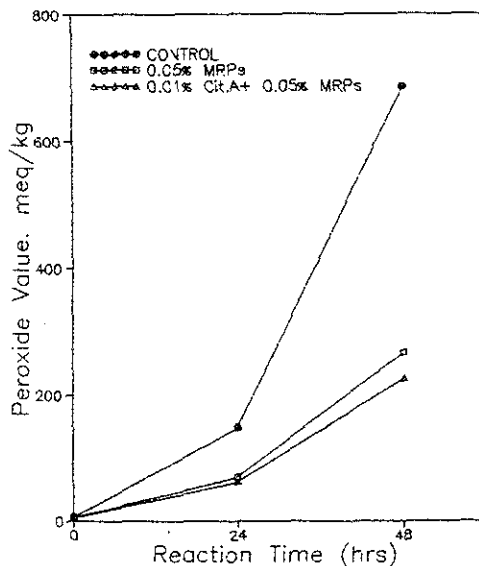


Fig. 2. Synergistic effect of citric acid on the antioxidative activity of soybean sauce melanoidin related products (MRPs) during the oxidation of linoleic acid mixture at 50°C for 48hrs.

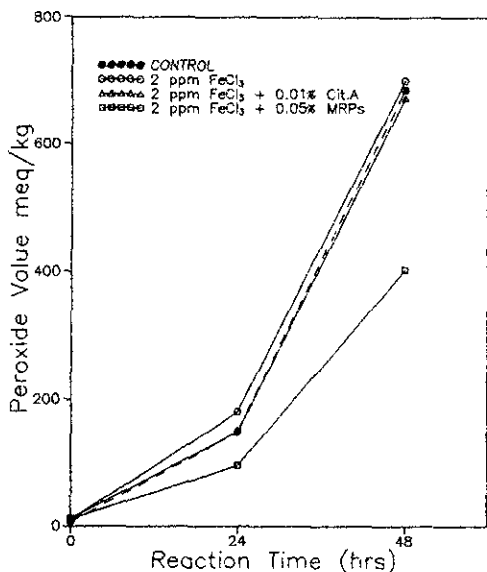


Fig. 3. Effects of soybean sauce melanoidin related products (MRPs) on the iron catalytic oxidation of linoleic acid mixture at 50°C for 48hrs.

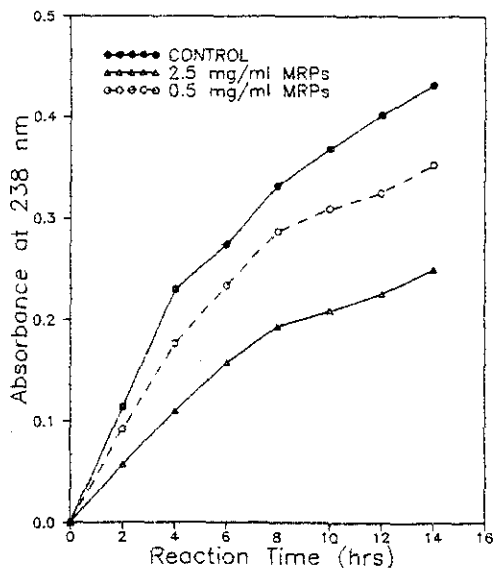


Fig. 4. Effects of soybean sauce melanoidin related products (MRPs) on the lipoxygenase catalytic oxidation of linoleic acid(99%) at 25°C.

가구와 비교할때 다소 높은 항산화능을 지니고 있다 (Fig. 2). 이것은 산화되기 쉬운 리놀레산 혼합물의 반응 시스템에서 구연산이 MRPs의 항산화 작용을 상승시킨 것으로 추정되었다⁸⁾. “MRPs + 구연산 첨가구”에서 구연산의 상승효과는 MRPs와 구연산 간 수소결합에 의한 것으로 사료된다. 그러나, 구연산 단독으로 첨가될 경우에는 리놀레산 혼합물의 자동산화 메카니즘을 변경하지 않는다는 보고^{11,12)} 등이 있다.

한편, 넓은 의미에서의 효력상승제는 페놀과 아민류와 같은 항산화 물질들의 혼합물(A형), 함황 화합물이나 페놀류와 같은 과산화물 제거제(B형), 구연산, 아스코르빈산, 인산과 같은 킬레이터(C형) 등으로 분류하는데, C형은 free radical chains 반응을 연속적으로 촉진하는 금속의 봉쇄, 즉, 금속의 산화 촉진작용을 억제하여 주는 금속 제거제로써 작용을 하는 것으로 보고¹¹⁾ 되었다.

한편, melanoidins reductone moiety는 강한 금속결합 기능¹³⁾을 가지고 있으므로 MRPs의 금속 착화합물 형성력을 살펴본 결과는 Fig. 3과 같다. “염화제일철 + MRPs 첨가구”가 염화제일철 단독 첨가구보다도 과산화물 생성이 적은 것은 MRPs의 금속 킬레이터 기능 때문일 것으로 추정된다¹¹⁾.

이와같이 MRPs는 미량금속의 촉매효과를 감소시키는 킬레이터로써의 기능 등으로 항산화제의 작용을 상승시키고 있으며, 수소 혹은 전자 공여로 기인된 자동

산화 억제하는 반응과 직접적으로 관련 될 것으로 판단된다^{8,12)}.

효소적 산화반응에 미치는 영향

Cis, cis-1,4 pentadiene system을 포함하는 불포화지방산의 산화를 촉매하는 리폭시게나아제는 식품의 질적 변패를 야기할 것으로 보고되고 있다^{14,15)}. 본 실험에서는 리놀레산(99%)의 리폭시게나아제 촉매반응에 있어, MRPs의 저해 효과를 살펴보았으며 그 결과는 Fig. 4와 같다. 즉, 2.5mg/ml 농도에서 효소활성 저해로 인하여 conjugated dienoic acid의 형성이 억제된 것을 볼 수 있었으며 0.5mg/ml 농도에서도 대조구와 비교되는 효소활성 저해를 나타내었다.

ESR 연구에 의하면 리폭시게나아제의 효율적인 저해제는 리놀레산 산화촉매형태인 ferric 리폭시게나아제(활성형)을 ferrous 리폭시게나아제(불활성형)로 환원 시킴이 보고된 바 있으며¹⁶⁾ 이와 같은 리폭시게나아제 활성 저해는 리놀레산의 산화반응에 있어서 conjugated dienoic acid의 생성저해 뿐만 아니라 산소 흡수량을 억제하는 효과를 나타내었다¹⁴⁾.

MRPs의 리폭시게나아제 활성 저해현상은 식품 및 여러가지 생체 시스템에서도 일어날 가능성이 있으며, 앞으로 그 특성과 역할에 대한 규명이 흥미있는 과제의 하나로 여겨진다^{14,15)}.

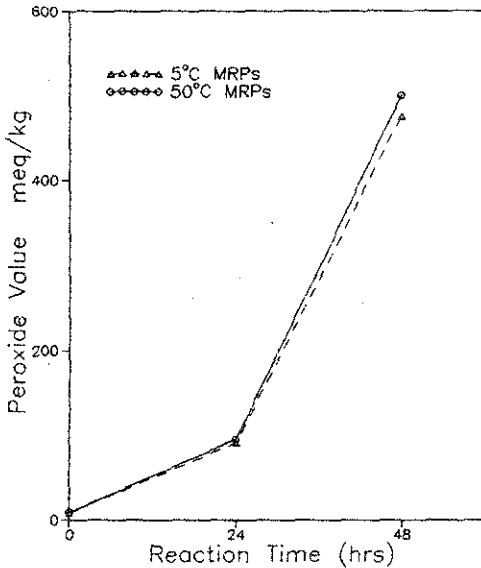


Fig. 5. Comparison of antioxidative properties of soybean sauce melanoidin related products(MRPs), which were stored at 5°C and 50°C for 15days, on the oxidation of linoleic acid mixture at 50°C for 48hrs.

저장 안전성

MRPs를 증류수에 용해시켜 20mg% 농도로 하여 5°C와 50°C에서 각각 15일 동안 저장한 후 50°C에서 48시간 동안 산화시킨 다음, 그 항산화 효과를 비교한 결과는 Fig. 5와 같다. 서로 다른 온도하에 저장된 MRPs의 항산화 효과는 거의 같은 결과를 보이고 있다. Lingnert와 Waller⁴⁾에 의하면 동결건조된 histidine-glucose reaction mixture를 55일 동안 상온과 -18°C (질소가스 하)에 저장하였을 때 항산화 효과의 차가 없다는 보고와 본 실험의 결과가 일치하는 경향을 보였다. 이와같이 50°C에서 15일간 저장되어 있어도 항산화 효과의 소실이 거의 없었으므로, 간장에서 분리한 MRPs는 항산화성에서 상당히 안전한 물질이라고 사료된다.

요 약

양조간장 분말을 Sephadex 겔 여과 크로마토그래피 법으로 분획한 후, 가장 갈색도가 높은 melanoidin 관련 물질의 획분인 melanoidin related products(MRPs)을 모아 동결 건조시킨 다음, 이의 free radical scavenger 기능, 항산화 효력상승제의 기능과 금속 킬레이터로서의 기능, 리폭시게나아제 활성 저해능, 그리고 저장안전성 등에 대한 항산화 특성을 고찰한 결과 다

음과 같다. MRPs는 첨가농도(혹은 갈색도)의 증가에 따라 과산화물의 생성을 저해하였으며, 그 항산화력은 α -토코페롤 보다는 낮았다. 그리고 free radical scavenger로서의 능력을 가지고 있어 리놀레산 혼합물의 산화를 지연 시켰으며, 열화제일철에 의하여 촉매된 산화반응에서 synergistic antioxidative effect를 나타내었다. 또한 양조간장 MRPs는 리폭시게나아제 활성을 저해하여 conjugated dienoic acid 생성량을 감소시켰다. 한편, 이 MRPs는 저장 안전성이 상당히 있어, 50°C에서 15일간 저장되어 있어도 항산화 효과의 상실이 거의 없음을 관찰되었다.

문 헌

1. 최홍식 : 간장의 풍미성분 및 안정성 관련성분. 한국간장에 관한 심포지엄, 한국농화학회지 영남지부, p. 29(1988)
2. 최홍식, 이정수, 문갑순, 박건영 : 지방산의 산화에 대한 양조간장의 항산화 특성. 한국식품과학회지, 22(3), 332(1990)
3. 문갑순, 최홍식 : 양조간장으로부터 항산화성 물질의 분리 및 그 특성. 한국식품과학회지, 22(4), 461(1990)
4. Lingnert, H. and Waller, G. R. : Stability of antioxidants formed from histidine and glucose by the maillard reactions. *J. Agric. Food Chem.*, 31, 27(1983)
5. Hayase, F. and Kato, H. : Antioxidative components of sweet potatoes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 30, 37(1984)
6. 김상달, 도재호, 오훈일 : 고려인삼 갈변물질의 항산화 효과. 한국농화학회지, 24, 161(1981)
7. Rogstad, A. and Reinton, R. : A gas chromatographic method for testing antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 54, 282(1977)
8. Ikeda, N. and Fukuzumi, K. : Synergistic antioxidant effect of nucleic acids and tocopherol. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 54, 360(1977)
9. 유병진 : Amino acid-xylose 갈변 반응물질의 항산화성. 부산수산대학교 박사학위논문(1985)
10. Wu, C. H., Russel, G. F. and Powrie, W. D. : Paramagnetic behavior of model system melanoidins. *Dev. Food Sci.*, 13, 135(1986)
11. Min, D. B. and Wen, J. : Effects of citric acid and iron levels on the flavor quality of oil. *J. Food. Sci.*, 48, 791(1983)
12. Patterson, H. B. W. : Antioxidant. In "Handling and storage of oilseeds, oils, fats and meal" Elsevier science publishing Co., New York, p.45(1989)
13. Johnson, P. E., Lykken, G., Mahalko, J., Milne, D., Inman, L., Garcia, W. J. and Inglett, G. E. : The effect of browned and unbrowned corn products on absorption of zinc, iron and copper in humans. ACS Symposium series. 215, Am. Chem. Soc., Washington, DC, p. 349(1983)

14. King, D. L. and Klein, B. P. : Effect of favonoids and related compounds on soybean lipoxygenase-1 activity. *J. Food Sci.*, **52**(1), 220 (1987)
15. Imai, S., Morikiyo, M., Furihata, K., Hayakawa, Y. and Seto, H. : Turmeronol A and turmeronol B, new inhibitors of soybean lipoxygenase. *Agric. Biol. Chem.*, **54**(9), 2367(1990)
16. Kemal, C., Louis-Flamberg, P., Krupinski-Olsen, R. and Shorter, A. L. : Reductive inactivation of soybean lipoxygenase 1 by catechols. A possible mechanism for regulation of lipoxygenase activity. *Biochemistry*, **26**, 7064 (1987)

(1993년 2월 3일 접수)