

재래식 메주 및 된장 중의 항산화성 물질에 관한 연구

4. 페놀화합물의 함량과 항산화력

김미혜 · 임상선 · 유영법 · 김경업 · 이종호[†]

경상대학교 식품영양학과

Antioxidative Materials in Domestic Meju and Doenjang

4. Separation of Phenolic Compounds and Their Antioxidative Activity

Mi-Hye Kim, Sang-Sun Im, Young-Bup Yoo, Gyeong-Eup Kim and Jong-Ho Lee[†]

Dept. of Food Science and Nutrition, Kyungsang National University, Jinju 660 - 701, Korea

Abstract

In order to investigate the antioxidant activity of phenolic compounds contained in domestic Meju and Doenjang, the methanolic extract from defatted Meju and Doenjang was fractionated into the phenolic acid and the isoflavone fractions by alumina column and polyamide-6 column chromatography, respectively. Both phenolic acid and isoflavone fractions exhibited an identical antioxidative effect against the oxidation of linoleic acid. GC analysis revealed that the phenolic acid fraction contained vanillic, chlorogenic, *p*-coumaric, ferulic, and caffeic acid. The content of caffeic acid was greater than 70% in the phenolic acid fraction and the content of vanillic and chlorogenic acids were disappeared during fermentation, and thus, the facts are thought to be reasons for the low antioxidant activity of the phenolic acid fraction from Doenjang. Similarly, the isoflavone fraction contained daidzin, glycitin-6-O-glucoside and genistin and their aglycons such as daidzein, glycinein and genistein. The content of daidzin and genistin in Meju dramatically decreased at the early stage of fermentation, whereas the content of daidzein and genistein rather increased; however, these changes in isoflavone contents did not affect the antioxidant activity of isoflavone fractions.

Key words : Meju, Doenjang, antioxidation, phenolic acid, isoflavone

서 론

대두 중에 함유된 항산화성 물질로써는 tocopherol, isoflavones 및 phenolic acids 등을 들 수 있는데 isoflavones로는 daidzin, genistin 및 glycitin-6-O-glucoside가 밝혀졌고 phenolic acids로는 함량이 가장 높은 caffeic acid를 위시하여 6종이 분석되었다¹⁻¹⁰. 한편 tempeh와 같은 대두의 발효 제품 중에는 tocopherols의 함량은 감소되고 isoflavones은 β -glucosidase의 작용에 의하여 aglycone이 유리되어 항산화력을 오히려 증가되는 것으로 밝혀지고 있다¹¹. 대두 중에 함유된 isoflavones은 약 2.5%로 측정되고 있는데 Naim 등¹²과 Murakami 등¹³

은 대두의 가수분해물과 발효 후의 tempeh 중에 생성된 genistein, daidzein 및 glycinein의 함량을 분석하였고 tempeh로부터 6,7,4-trihydroxy isoflavone을 분리한 바도 있다. 그러나 한국의 전통 발효식품인 메주와 된장 중에 함유된 페놀화합물의 항산화 효력에 대하여는 연구된 바가 없으므로 본 연구에서는 재래식 메주 및 된장의 발효 및 숙성기간 중에 isoflavones과 phenolic acids의 함량 변화를 조사하고 항산화 효력을 측정하였다.

재료 및 방법

시료

전보¹⁴에서와 동일한 시료를 사용하였다. 즉 재래식 방법으로 80일간 발효시킨 메주와 발효 후의 메주를 18%의 소금물에 60일간 침지한 후 간장을 걸러내고 60일간 숙성시킨 된장을 발효 및 숙성기간별로 채취

[†]To whom all correspondence should be addressed

¹ 이 연구는 1990년도 한국과학재단 연구비 지원에 의한 결과의 일부임.

하여 동결건조시키고 탈지분쇄하여 시료로 하였다.

페놀화합물의 추출

Pratt와 Birac⁹⁾의 방법에 따라 페놀화합물을 추출하였다. 즉 시료를 n-hexane으로 탈지하고 잔사를 메탄올에 16시간 침지시킨 후 80°C에서 90분간 환류 냉각한 다음 여과지 (whatman #42)로써 여과하여 여액을 40°C에서 감압농축한 것을 메탄올성 추출물로 하였다.

Phenolic acids의 분리

메탄올성 추출물을 alumina (4% H₂O 함유) 칼럼에 흡착시키고 ether/hexane (1 : 1 v/v)용액으로 세척한 다음 6% formic acid-diisopropyl ether용액으로 phenolic acids 구분을 용출 분리하였다.

Isoflavones의 분리

메탄올성 추출물을 n-butanol/H₂O (1 : 1 v/v)용액에 녹여서 분배시킨 후 n-butanol층을 감압농축하여 polyamide-6 칼럼에 흡착시키고 메탄올로써 isoflavones 구분을 용출 분리하였다.

페놀화합물의 TLC에 의한 분리

Alumina와 polyamide-6 칼럼에서 용출 분리한 phenolic acids와 isoflavones를 polyamide-6 plate상에서 CHCl₃/MeOH/AcOH/H₂O (25 : 15 : 1 : 2 v/v)로써 전개하여 조성분을 분리하였다.

페놀화합물의 GC에 의한 분석

칼럼 크로마토그래피에서 용출 분리한 phenolic acids와 isoflavones 구분의 용매를 제거하고 각각에 TMS시약 0.5ml을 가하여 100°C의 수조에서 1시간 동안 반응시킨 후 GC로써 분석하였다. GC 분석조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Instrumental conditions for GC analysis of phenolic acids and isoflavones

Instrumental	Hewlett Packard 5890 series 11GC, HP 3394 A Intergrator
Detector	Flame Ionization Detector
Column	Ultra 2 (Crosslinked 5% ph Me Silicone) 25 × 0.32mn × 0.52m film thickness
Column temp	180°C (1min)
Injector temp	270°C
Detector temp	280°C
Chart speed	5mm/min
Carrier gas	N ₂ , 1.4ml/min

항산화력의 측정

시료로 부터 추출 분리한 페놀화합물을 linoleic acid에 1%의 농도로 첨가하고 carbonyl free ethanol용액 20ml와 0.2M 인산 완충액 25ml를 가하여 용해시킨 후 40°C에서 보존 중의 과산화물가 (AOAC 공정법¹⁰⁾)와 카아보닐가 (2,4-dinitrophenylhydrazine법¹¹⁾)의 변화를 측정하였다.

결과 및 고찰

메탄올성 추출물의 항산화성

맥주와 된장 중에 함유된 페놀화합물의 항산화 효력을 조사하기 위하여 원료로 사용한 대두와 발효 숙성 중의 맥주 및 된장을 동결건조하여 탈지 분쇄한 후 메탄올 가용성물질을 추출하였다. 메탄올 가용성물질의 추출량은 시료의 중량에 대하여 각각 8.1%, 8.9% 및 9.5%이었다. 맥주와 된장의 메탄올성 추출물을 linoleic acid에 1% 농도로 첨가하여 항산화 효력을 측정한 결과 (Fig. 1, 2)를 보면 40°C에서 9일간 경과된 후의 대조구의 과산화물가는 1916.7meq/kg인데 비하여 각 시료 첨가구의 과산화물가는 크게 억제되어 80일 발효시킨 맥주와 60일 숙성시킨 된장의 메탄올성 추출물 첨가구에서는 각각 46.8meq/kg과 56.2meq/kg으로 측정되었다. 카아보닐가에서도 과산화물가와 같은 경향으로 메탄올성 추출물 첨가구는 대조구에 비하여 아주 낮은 값을 유지하여 강한 항산화 효력을 나타내었다.

Phenolic acids의 함량 및 항산화성

각 시료의 메탄올성 추출물 중의 phenolic acids를 분리하기 위하여 alumina 칼럼크로마토그래피를 이용하여 분리 용출하였을 때 phenolic acids 구분의 용출량은 칼럼에 흡착시킨 추출물의 9~13%이었다. 칼럼 용출분을 polyamide-6 plate상에 전개하여 분리한 결과 (Fig. 3)에서 Rf치 0.38의 caffeic acid와 Rf치 0.74의 p-coumaric acid, Rf치 0.80의 ferulic acid 및 Rf치 0.82의 syringic acid 등은 표준품과 동일한 위치에서 검출되었으나 Rf치 0.28의 chlorogenic acid와 Rf치 0.84의 vanillic acid는 검출되지 않았다. Phenolic acids 구분을 GC로써 분석한 결과 (Fig. 4)로 부터 각각의 함량변화 (Table 2)를 보면 대두에서는 vanillic acid와 chlorogenic acid가 분석되었으나 맥주 발효 중에는 vanillic acid가 소멸되었고, 된장 숙성 중에는 chlorogenic acid가 분석되지 않았다. 그러나 syringic acid, p-coumaric acid, ferulic acid 및 caffeic acid의 함량은 맥주발효 및 된장숙

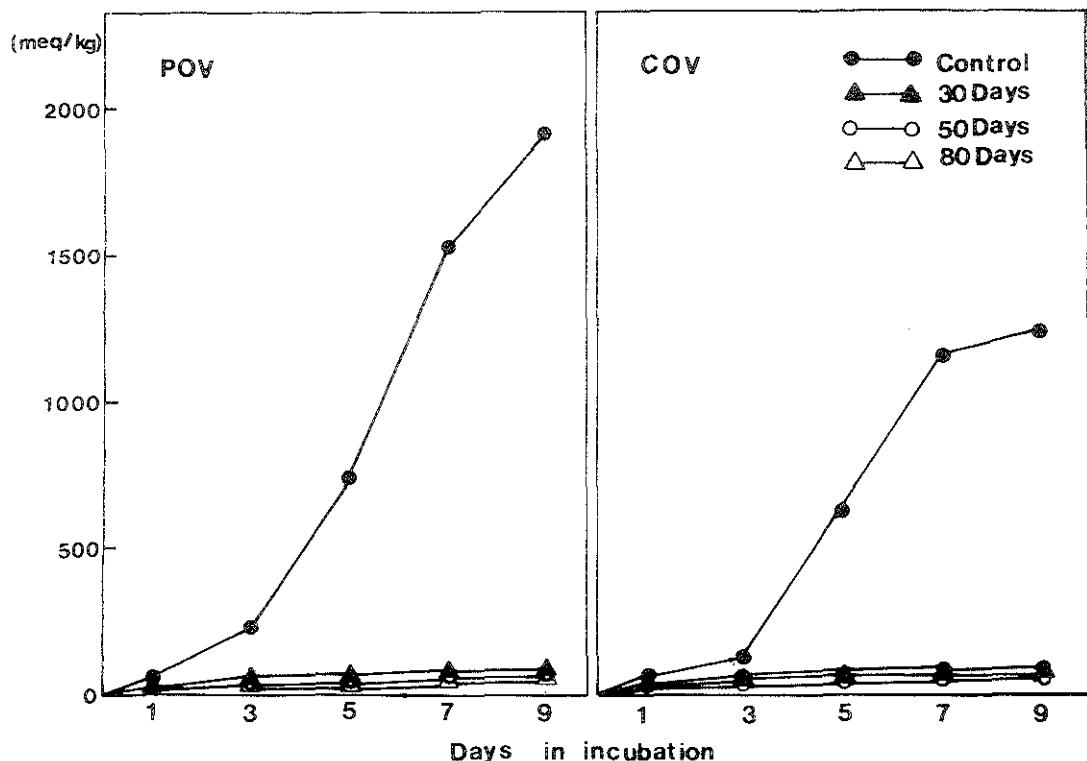


Fig. 1. Changes in peroxide and carbonyl values of linoleic acid after addition of phenolic compounds extracted from Meju at 1% level.

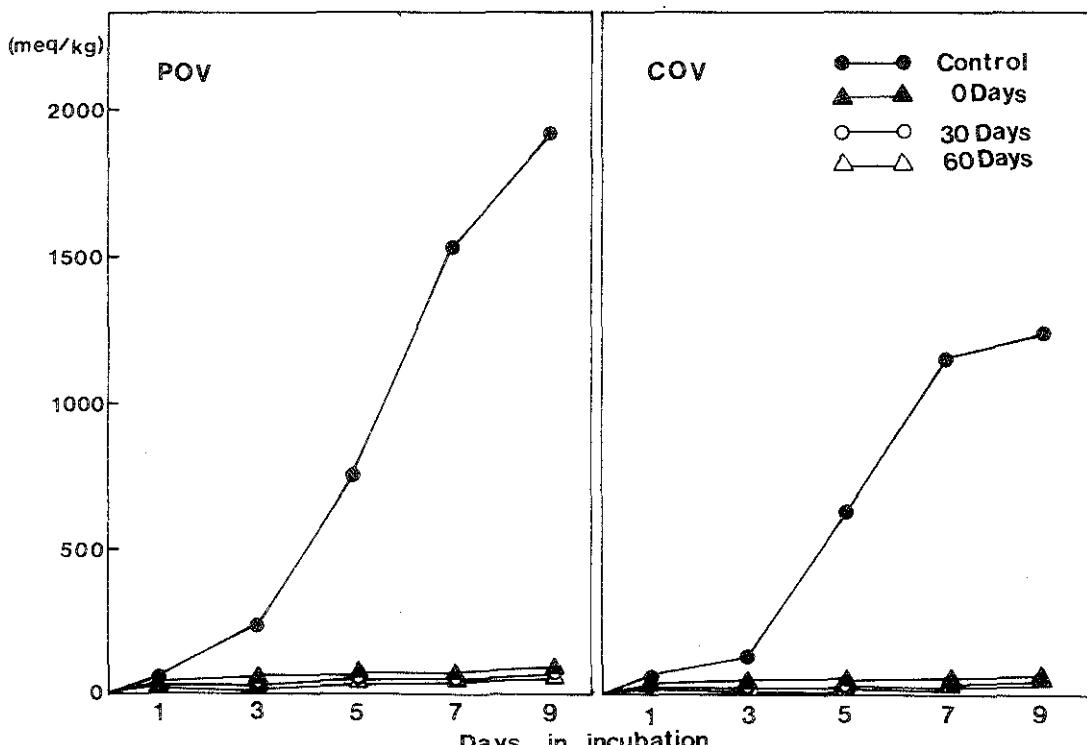


Fig. 2. Changes in peroxide and carbonyl values of linoleic acid after addition of phenolic compounds extracted from Doenjang at 1% level.

성 중에 큰 변화가 없는 것으로 나타났으므로 대두 중에 함유된 phenolic acid 중에서 vanillic acid와 chloro-

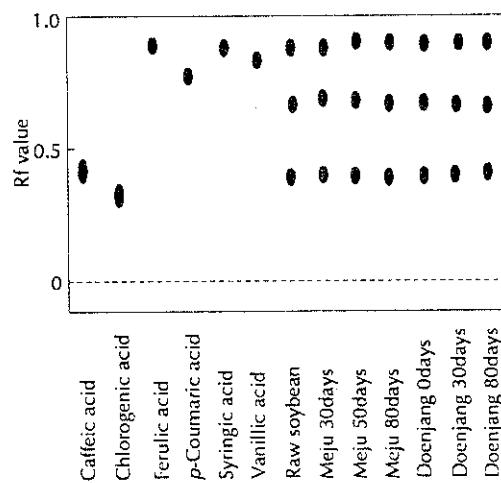


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of phenolic acids extracted from Meju and Doenjang.

*Plate : polyamide-6, **developer : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O} = 25:15:1:2, \text{v/v}$

genic acid는 가열처리 및 발효 중에 분해되기 쉬운 것으로 생각되었다.

Alumina 칼럼에서 분리한 phenolic acids 구분의 항산화 효력을 조사하기 위하여 linoleic acid에 1% 농도로 첨가한 후 40°C 보존 중의 과산화물기를 측정한 결과(Table 3)를 보면 보존 5일째의 대조구의 과산화물기는 770.1 meq/kg이었는데 대두와 80일간 발효시킨 메주 및 60일간 숙성시킨 된장에서 추출한 phenolic acids 구분의 첨가구에서는 각각 30.9 meq/kg 38.1 meq/kg 및 48.2 meq/kg으로써 항산화 효력을 나타내었다. 그 중에서 된장 중의 phenolic acids 구분의 항산화 효력이 대두나 메주의 것에 비하여 낮은 것은 phenolic acids 중에서도 항산화 효력이 가장 강한 것으로 밝혀진 chlorogenic acid^[12]의 함량이 감소하였기 때문으로 추정된다.

Isoflavone의 함량 및 항산화성

각 시료의 베탄올성 추출물로부터 polyamide-6 칼럼에 의하여 분리된 isoflavones 구분의 용출량은 메주에서 25~33%이었으나 된장에서는 10~16%로써 크게

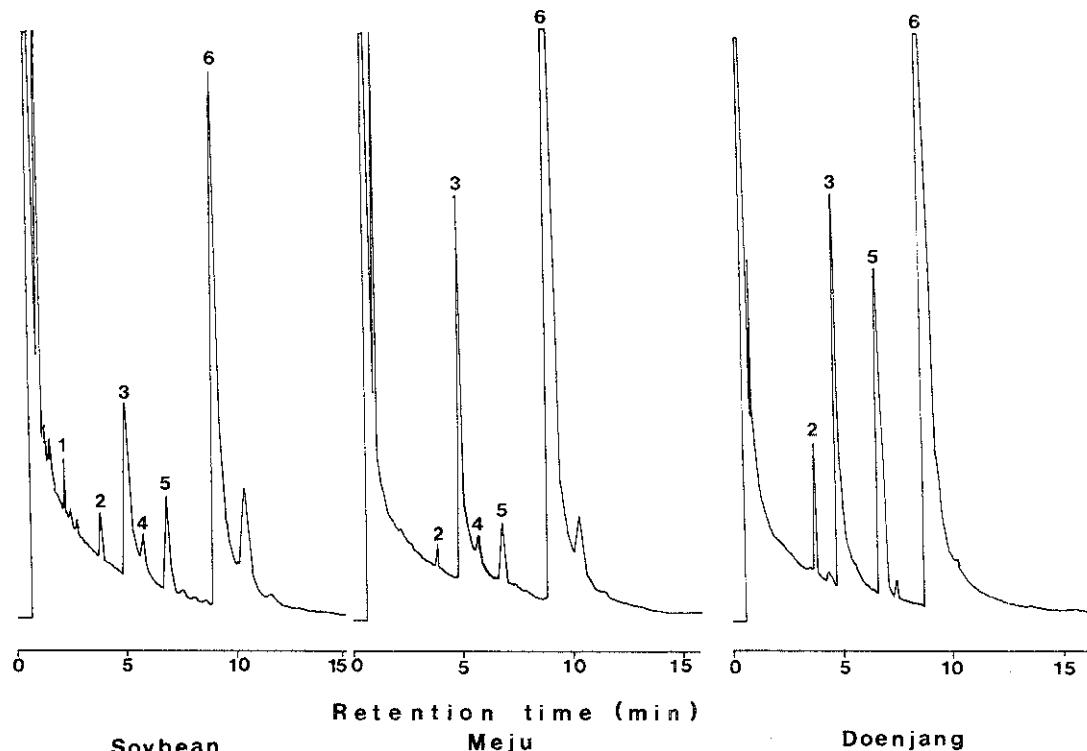


Fig. 4. Gas chromatogram of the phenolic acids extracted from Soybean, Meju and Doenjang.

1. vanillic acid, 2. syringic acid, 3. p-coumaric acid, 4. chlorogenic acid, 5. ferulic acid, 6. caffeic acid

Table 2. Changes in content of phenolic acids in Meju and Doenjang during fermentation

(% area)

Phenolic acid	Raw soybean	Meju			Doenjang		
		30days	50days	80days	0days	30days	60days
Vanillic acid	2.30	0.22	—	—	—	—	—
Syringic acid	1.63	0.52	0.70	0.42	2.44	1.98	2.06
p-coumaric acid	18.04	14.62	15.87	14.04	19.67	19.55	18.05
Chlorogenic acid	4.53	0.80	0.54	0.46	—	—	—
Ferulic acid	6.85	4.36	3.01	2.69	5.57	5.73	4.96
Caffeic acid	66.61	78.48	78.88	82.39	71.60	72.68	74.23
Total	99.96	100.00	100.00	100.00	99.28	99.94	99.30

Table 3. Changes in peroxide values of linoleic acid after addition of phenolic acid fraction at a 1% level

Sample	Days of storage	
	3	5
Control	230.4	770.1
Raw soybean	24.7	30.9
Meju		
30days	30.6	34.1
50days	32.0	40.1
80days	32.6	38.1
Doenjang		
0days	35.1	39.1
30days	42.2	47.7
60days	44.1	48.2

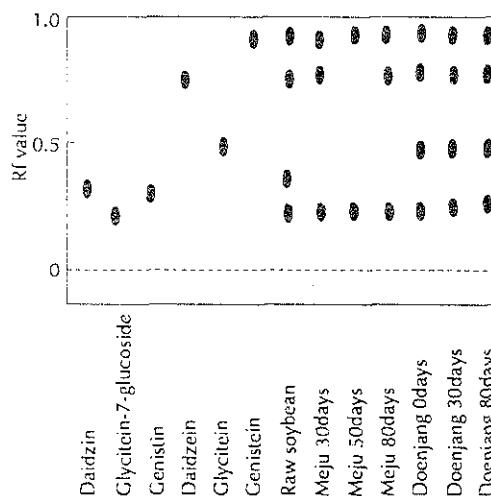


Fig. 5. Thin-layer chromatogram of isoflavones extracted from Meju and Doenjang.

*Plate : polyamide-6, **developer $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O} = 25 : 15 : 1 : 2, \text{v/v}$

감소하였다. 용출된 isoflavones 구분을 polyamide-6 plate에 전개시킨 결과(Fig. 5), daidzin, glycitein-7-O-glucoside 및 genistein이 각각 R_f 치 0.30, R_f 치 0.22 및

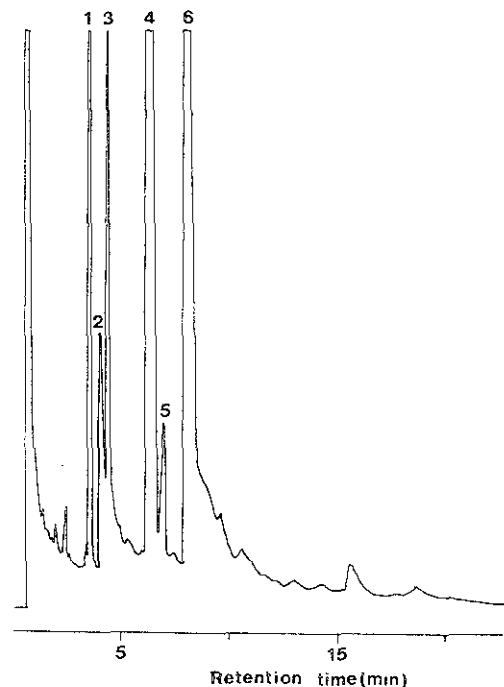


Fig. 6. Gas chromatogram of the isoflavones extracted from Meju.

- 1. daidzin 2. glycinein- α -glucoside
- 3. genistin 4. daidzein
- 5. glycinein 6. genistein

R_f 치 0.32 부근에서 검출되었으며 이를 화합물의 가수 분해에 의하여 생성된 aglycone인 daidzein, glycinein 및 genistein은 각각 R_f 치 0.63, R_f 치 0.45 및 R_f 치 0.90 부근에서 검출되었다. 그 중에서 glycinein은 발효 중의 메주에서는 명확하게 검출되지 않았다.

메주와 된장 중의 isoflavones 함량을 측정하기 위하여 GC로써 분석한 결과(Fig. 6, Table 4)를 보면 대부분에는 daidzin과 genistin이 23.19%의 높은 함유율을 보였고, daidzein과 genistein도 7.62%와 13.80%로 비교적 많이 함유되어 있었다. 메주의 발효 중에는 발효 초

Table 4. Changes in content of isoflavones in Meju and Doenjang during fermentation

(% area)

Isoflavone	Raw soybean	Meju			Doenjang		
		30days	50days	80days	0days	30days	60days
Daidzin	23.19	6.34	6.41	5.59	4.96	5.15	4.69
Glycitein-7-O-glucoside	10.60	2.40	2.50	2.76	3.58	4.53	4.42
Genistin	35.61	8.67	7.03	6.50	6.41	6.02	5.70
Daidzein	7.62	24.93	31.60	33.07	30.60	31.07	33.56
Glycitein	1.17	2.09	1.66	2.01	1.45	2.78	3.96
Genistein	13.80	31.57	40.80	45.63	43.11	50.75	47.90

Table 5. Changes in peroxide values of linoleic acid after addition of isoflavone fraction at a 1% level
(meq/kg)

Sample	Days of storage	
	3	5
Control	230.4	770.1
Raw soybean	34.1	36.6
Meju		
30days	33.6	39.1
50days	32.4	38.3
80days	31.1	34.1
Doenjang		
0days	32.7	37.1
30days	23.9	32.0
60days	22.0	30.6

기부터 isoflavone의 함량이 급격히 감소하였고 daidzein과 genistein의 함량은 크게 증가하였는데 glycitein의 함량이 glycitein-7-O-glucoside의 감소 정도에 비하여 낮게 나타난 것은 대두를 삶는 과정에서 용수 중으로 용출이 많았기 때문으로 생각된다. Naim 등⁶⁾이 대두의 가수분해물 중에서 분석한 genistein, daidzein 및 glycitein의 함량비는 각각 87.5%, 10.0% 및 2.5%로써 본 실험 결과인 된장의 47.90%, 33.56% 및 3.96%와는 genistein, daidzein에서 큰 차이를 보였고, Murakami 등⁷⁾에 의한 tempeh의 측정 결과(59.3%, 32.5% 및 8.1%)와 비교하면 genistein과 glycitein의 함량비가 낮았다. 이와 같은 함량차이는 Kitada 등¹³⁾이 Miso의 제조과정에서 밝힌 바와 같이 제조하는 과정 중에 용출되는 양의 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

Table 5는 polyamide-6 칼럼 크로마토그래피에서 분리한 isoflavones 구분의 항산화 효력을 측정한 결과인데 5일간 보존 후의 대조군의 과산화물가(770.1 meq/kg)에 비하여 isoflavones 구분의 첨가구에서는 과산화물가가 크게 억제되어 대두와 80일간 발효시킨 메주 및 60일간 숙성시킨 된장에서 각각 36.6 meq/kg, 34.1-

meq / kg 및 30.6 meq/kg의 낮은 값으로 측정되었다. Ebata 등⁵⁾은 대두 종의 isoflavones이 가수분해되어 aglycone 이 생성되면 항산화 효력이 증가되는 것으로 보고한 바 있으나 본 실험 결과에서 대두와 메주 및 된장으로부터 분리된 isoflavones 구분은 aglycone의 함량 차이가 큰데도 불구하고 항산화 효력에는 큰 차이가 없었다. 이상의 실험 결과에서 밝혀진 바와 같이 메주와 된장 중에 함유된 phenolic acids와 isoflavones은 함유량이 비교적 많을 뿐만 아니라 강한 항산화력을 나타내었으며 메주와 된장 중에 지질의 산화를 억제하는 데 크게 작용하고 있을 것으로 추정된다.

요 약

재래식 메주 및 된장 종에 함유된 폐놀 화합물의 항산화 효력을 조사하기 위하여 탈지 건조한 메주·된장으로부터 메탄올을 사용성물질을 추출하고 칼럼크로마토그래피로써 폐놀화합물 구분을 분리하여 항산화력을 측정하였다. 메탄올성 추출물로 부터 alumina 칼럼크로마토그래피에 의하여 분리된 phenolic acid 구분과 polyamide-6 칼럼크로마토그래피에 의하여 분리된 isoflavone 구분은 모두 linoleic acid에 대하여 대등한 정도의 강한 항산화 효력을 나타내었다. GC로써 분석한 결과, phenolic acid 구분 중에는 vanillic acid, chlorogenic acid, syringic acid, p-coumalic acid, ferulic acid 및 caffeic acid 등의 6개 화합물이 분석되었다. 주성분인 caffeic acid의 함량은 70% 이상을 차지하였고, vanillic acid와 chlorogenic acid는 메주의 발효 중에 소멸되어 된장에서 분리한 phenolic acid 구분의 항산화효력이 감소되는 원인으로 추정되었다. Isoflavone 구분에서는 daidzin, glycitin-6-O-glucoside 및 genistin과 이들 화합물의 aglycone인 daidzein, glycitein 및 genistein 등의 6개 화합물이 분석되었는데 daidzin과 genistin의 함량은 메주의 발효초기에 급속히 감소하고, daidzein과 ge-

nistein의 함량이 크게 증가하였으나 isoflavone 구분의 항산화 효력에는 큰 차이가 없었다.

문 현

1. Hammerschmidt, P. and Pratt, D. : Phenolic antioxidants of dried soybean. *J. Food Sci.*, **43**, 566 (1978)
2. Rhee, K. S., Ziprin, Y. A. and Rhee, K. C. : Antioxidant activity of methanolic extracts of various oilseed protein ingredients. *J. Food Sci.*, **46**, 75 (1981)
3. Pratt, D., Pietro, C. D., Porter, W. L. and Giffee, J. W. : Phenolic antioxidants of soy protein hydrolyzates. *J. Food Sci.*, **47**, 24 (1982)
4. Hayer, R. E., Bookwalter, G. N. and Bagley, E. B. : Antioxidant activity of soybean flour and derivatives-A review. *J. Food Sci.*, **42**, 1527 (1977)
5. Ebata, J., Fukuda, Y., Hiiai, K. and Murata, K. : β -Glucosidase involved in the antioxidant formation in tempeh, fermented soybean. *J. Agric. Chem. Soc.*, **46**, 323 (1972)
6. Naim, M., Gsterner, B., Zikah, S., Birk, Y. and Bondi, A. : Soybean isoflavones. Characterization, determination, and antifungal activity. *J. Agric. Foods Chem.*, **22**, 806 (1974)
7. Murakami, H., Asakawa, T., Terao, J. and Matsushita, S. : Antioxidative stability of tempeh and liberation of isoflavones by fermentation. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2971 (1984)
8. 김미해, 임상선, 김성희, 김경업, 이종호 : 채래식 메주 및 된장 중의 항산화성 물질에 관한 연구. 제2보. 지용성 갈변물질의 분리와 항산화력. *한국영양식량학회지*, **23**, 251 (1994)
9. Pratt, D. E. and Birac, P. M. : Phenolic antioxidant activity of soybeans and soy products. *J. Food Sci.*, **44**, 1720 (1979)
10. A.O.A.C. : *Official Method of Analysis*. 14th ed., Association of official analytical chemists, Washington, D. C., p.223 (1980)
11. Hernic, A. S., Benca, M. F. and Mitcell, Jr. : Estimating carbonyl compounds in rancid fats and food. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **31**, 38 (1954)
12. Pratt, D. E. : Water soluble antioxidant activity in soybeans. *J. Food Sci.*, **37**, 322 (1972)
13. Kitada, Y., Mizobuchi, M., Ueda, Y., Yamamoto, M., Ishikawa, M. and Kawanishi, S. : Recovery of isoflavones from soybean cooking drain of a miso factory. *J. Food Sci. Technol.*, **33**, 821 (1986)

(1994년 5월 16일 접수)