

## 축산제품에 응용하기 위한 콩제품 추출물의 항산화 능력에 관한 연구

이치호\* · 문성용 · 이종철 · 이지영  
건국대학교 축산대학 축산가공학과

### Study on the Antioxidant Activity of Soybean Products Extracts for Application of Animal Products

Chi-Ho Lee\*, Seong-Yong Moon, Jung-Chil Lee, and Ji-young Lee  
Dept. of Animal Products Science, Faculty of Animal Life Science, Konkuk University

#### Abstract

This study was performed to investigate the antioxidative activity of soybean products extracts using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and thiobarbituric acid (TBA) method for application of animal products. All three extracts (natto, soybean paste, soybean milk extract) were found to have an ability to donate hydrogen to DPPH. Especially, natto and soybean paste extract were more effective than that of soybean milk on the antioxidative activities. Natto and soybean paste extract were stronger than butylhydroxy toluene (BHT), butyl hydroxyl anisole (BHA) ( $5 \times 10^{-4}$  M) and ascorbic acid ( $5.7 \times 10^{-3}$  M) previously well known as antioxidants. These extracts also showed a synergistic effect. TBA values of natto (45.8%) and soybean paste extract (45.2%) were stronger than that of soybean milk extract (33.6%). These results suggest that soybean product extracts have antioxidative activities and synergistic effects.

Key words : antioxidant, natto, soybean milk, soybean paste, animal products

#### 서론

지질의 자동 산화는 산소, 빛, 온도, 중금속, 색소, 수분활성도, 효소 등과 같은 여러 가지 인자들에 의해 촉매되며, 또한 지질을 구성하는 지방산의 불포화도 정도에도 의존된다(Halliwell et al., 1993). 항산화제는 산화로 인한 여러 가지 바람직하지 않은 화합물의 형성을 방지하기 위해 지질 시스템 내에 첨가되어진다. 항산화 효과가 뛰어나고 값이 싼 인공합성 항산화제로 널리 사용되고 있는 BHA(butylated hydroxyanisole) 및 BHT(butylated hydroxytoluene)는 높은 안정도, 낮은 비용, 그리고 매우 높은 효율을 나타내지만 합성 식품첨가물의 부작용으로 인한 일반적인 기피현상뿐 아니라 기타 부작용에 기인해 일정한 규제 하에 사용되고 있는 실정이다

(Branen, 1975). 그리하여 최근 천연물, 특히 인간이 오랫동안 먹어온 식물에서 항산화 효과가 있는 물질을 분리, 이용하려는 시도가 활발하다. 천연물 중 항산화성 물질로는 L-ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol, carotenoids, flavonoids, maillard 반응물, 아미노산, 펩티드, 단백질과 phospholipids 등이 알려져 있다(Hahm et al., 1993; Shin, 1997). 콩에는 독특한 기능성을 갖는 많은 생리활성물질이 존재하는데, 이 중 isoflavone은 몇몇 식물에 함유되어 있기는 하나 특히 대두에 많이 함유되어 있는 것으로 보고되고 있다(Harborne, 1994; Reinli et al., 1996).

생리활성 물질로써 대두의 isoflavone은 그 함량뿐만 아니라 가공 중에 변화되는 isoflavone의 profile에 관심이 집중되고 있다. 가공중의 가열 온도와 효소의 존재는 isoflavone profile은 물론 함량에도 변화를 가져온다(Reramoto et al., 1994).  $\beta$ -glucosidase는 대두 자체에 존재하거나 된장이나 청국장과 같은 대두 발효 식품 제조 시 미생물 (*Rhizopus oryzae*, *Bacillus natto*나 *Bacillus subtilis* 등)에 의하여 생산된다(Custer et al., 1994; Custer et al., 1999; Takahashi et al., 1996).

\* Corresponding author : Chi-Ho Lee, Dept. of Animal Products Science, Faculty of Animal Life Science, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea. Tel: 82-2-450-3681, Fax: 82-2-453-1948, E-mail: leeche@konkuk.ac.kr

Isoflavone profile에 많은 전문가들이 관심을 가지는 이유 중 에 하나는 isoflavone isomer의 생물학적 활성이 다르기 때문 이다(Plumb et al., 1996). 모든 isoflavone은 소장 점막으로 흡 수되지만 aglycone 형태의 isoflavone은 glucoside형태보다 더 많은 양이 빠르게 흡수되며 항산화 활성도 높다(Brown et al., 2001; Izumi et al., 2000). 그러므로 aglycone이 많이 함유된 대 두 식품, 즉 발효 대두식품의 섭취는 다른 형태의 isoflavone 함유 대두 식품보다 여러 가지 질병 예방에 훨씬 더 효과적 이다. 전통적으로 한국에서 섭취되는 대두 식품은 된장, 청국 장, 간장과 같이 발효된 형태로 섭취되거나 낫콩, 콩가루, 두 유, 또는 두부와 같이 발효되지 않은 형태로 섭취된다. 발효 대두 식품은 발효 중에 상당량의  $\beta$ -glucoside가 미생물에 의 하여 생산된  $\beta$ -glucosidase에 의해서 aglycone으로 전환되어 생물학적 활성이 높은 aglycone의 함량이 높다고 보고되었다 (Choi et al., 1998; Kim et al., 1999). Isoflavone의 두 배당체의 형태를 Fig. 1에 나타내었다. 그러나 비 발효 대두 식품은 수 침 당시 대두 자체의  $\beta$ -glucosidase에 의해서 aglycone으로 전 환될 뿐 대부분이  $\beta$ -glucoside 형태로 존재하게 된다(Matsuura et al., 1993).

본 연구는 대두 식품의 항산화 활성을 DPPH의 수소 공여 능 및 TBA 방법을 통해 실험하여 그 결과를 보고하고, 아울 러 발효 대두 식품인 된장, 청국장과 비 발효 대두 식품인 두 유와의 항산화 활성의 차이와 기존에 사용되고 있는 항산화 제들과의 상승효과를 실험하여 이 결과를 축산식품에 첨가 해 응용하고자 수행되었다.

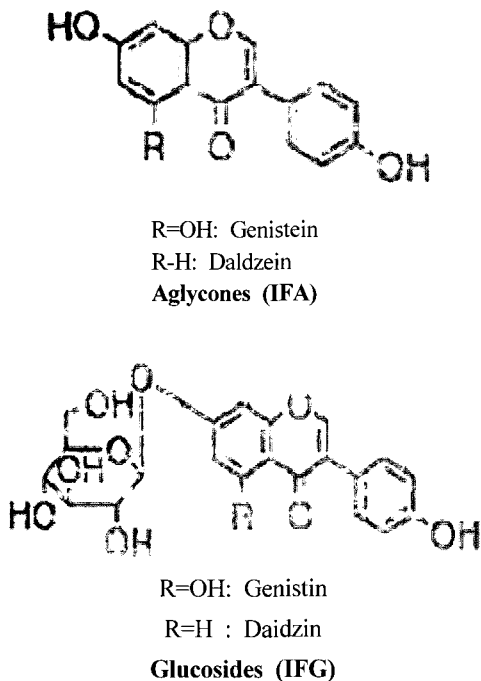


Fig. 1. Aglycones and glucosides.

공시재료

된장, 청국장은 (주)풀무원에서 판매되는 제품을 구입하여 사용하였으며 두유는 삼육식품에서 판매되는 제품을 구입하여 사용하였다. 된장과 청국장에서 사용된 대두는 수입콩으로 US. NO.1 이라는 동일품종의 대두로 만들어진 제품이며 두유 역시 미국산 대두로 만들어진 제품이다. BHA, BHT, ascorbic acid, TBA, TCA 및 리놀산은 Sigma사에서 생산한 제품을 구입하였고, 추출용매는 1급 시약을 사용하였다.

실험방법

시료전처리

시료의 전처리는 Chi(1999)의 방법을 수정하여 각각의 시료 50 g을 80% methanol과 1 : 200(w/v)이 되게 하여 24시간 동안 실온에서 교반한 후 와트만 여과지 No. 4로 여과하였다. 이 여과액을 회전식 진공 증발기를 이용하여 40℃ 이하에서 건조시킨 후 동결건조시켰다. 동결건조시킨 후 획득한 분말 을 -35℃이하에서 보관하며 시료로 이용하였다.

DPPH에 의한 수소 공여능

DPPH에 의한 수소 공여능 분석은 다음과 같이 수행하였 다. 된장, 청국장, 두유 추출물 1% 시료를 0.2 mL씩 취하고 여기에  $5 \times 10^{-4}$  M DPPH 용액 3.5 mL를 가하여 10초 동안 진 당한 뒤 실온에서 10분간 반응시킨 후 517 nm에서 10분간 흡 광도의 변화를 측정하였다. 대조구는 시료대신 ethanol을 사 용하였다. 그리고 항산화 활성을 다음과 같은 방법으로 억제 율로 나타내었다.

$$* \text{Inhibition}(\%) = [ (A - B) / A ] \times 100$$

A : absorbance of ethanol added samples

B : absorbance of 1% extract added samples

상승효과

상승효과를 보기 위해 Do 등(1999)의 방법에 따라 기존의 항산화제로 알려져 있는 BHA  $5 \times 10^{-4}$  M, BHT  $5 \times 10^{-4}$  M, ascorbic acid  $5.7 \times 10^{-3}$  M 농도로 조정 한 후, 이를 0.1 mL씩 취 하여 1% 시료 0.1 mL와 각각 혼합하여 같은 방법으로 DPPH 수소 공여능을 측정하였다.

TBA의 측정

TBA의 측정은 Mitsuda(1966)의 방법에 따라 수행하였다. pH 7.0 100 mM potassium phosphate buffer와 에탄올을 4:1로 혼합하고 이를 용매로 하여 30 mM linoleic acid를 만들어 기 질 용액으로 사용하였다. 이 기질용액 20 mL에 pH 7.0 100

mM potassium phosphate buffer 19.2 mL와 1% 시료 용액 0.8 mL를 더하고 40°C Water bath에서 24 hr 동안 방치하였다. 이 용액을 reaction solution으로 사용하였다. 2.0 mL 반응용액과 35% TCA(trichloroacetic acid) 1.0 mL와 0.75% TBA(thio-barbituric acid) 2.0 mL를 시험관에 넣고 30sec 동안 교반하고 95°C 이하의 water bath에서 40 min 방치한 후 실온에서 냉각시킨다. 1.0 mL acetic acid와 2.0 mL 클로로포름을 시험관에 혼합한 뒤 3,000 rpm에서 5 min간 원심분리한 후 그 상층액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신에 탄올을 사용하였다. 활성을 다음 방법으로 억제율로 나타내었다.

$$* \text{Inhibition}(\%) = [ (A - B) / A ] \times 100$$

A : absorbance of ethanol added samples

B : absorbance of 1% extract added samples

통계분석

모든 실험 결과는 SAS(1988)의 GLM(General Linear Model) 방법으로 분석하였으며 처리 평균 간의 비교를 위해 Duncan의 Multiple Range Test가 이용되었다.

결과 및 고찰

DPPH radical scavenging activity

항산화 물질의 가장 특징적인 역할인 oxidative free radical 반응을 이용한 후 환원성 물질의 분석시약인 DPPH 방법에 따라 시간 경과에 따른 콩 추출 화합물의 수소 공여능을 실험한 결과는 Fig. 2와 같다. 청국장, 된장, 두유 추출물의 수소 공여능에서 두유는 반응시간이 경과함에 따라 완만하게 감소하였고, 청국장과 된장 추출물은 두유보다 감소폭이 증

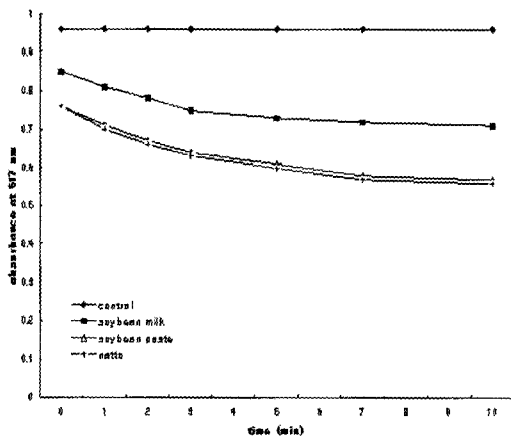


Fig. 2. Change of absorbance by the hydrogen donor properties of soybean products extracts.

가하였다. 청국장의 반응 초기에는 O.D가 0.75에서 반응후기에는 0.55로 약 21% 감소하였고 된장은 20% 감소하였으며, 두유의 경우는 15% 감소하였다.

시판 항산화제인 BHT, BHA 및 ascorbic acid와 콩 추출 화합물의 비교 실험한 결과는 Fig. 3과 같다. 청국장, 된장 추출물의 경우에는 BHA 5×10<sup>-4</sup> M, BHT 5×10<sup>-4</sup> M 및 ascorbic acid 5.7×10<sup>-3</sup>M 보다 강하였으며, 두유 추출물의 경우에는 반응초기 BHT보다 강하였으나 시간이 경과함에 따라 시판 항산화제보다 약하였다. 콩 제품 추출물은 DPPH와 반응하여 시간이 경과함에 따라 감소하고, 시판 항산화제인 ascorbic acid는 반응초기에 완료되는 결과를 보이는 반면 BHT와 BHA는 지속적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

콩제품 추출물질과 합성항산화제와의 상승 효과

BHT, BHA 및 ascorbic acid의 기존 항산화제와 콩 제품 추출물과의 상승 효과를 실험한 결과는 Fig. 4~6과 같다.

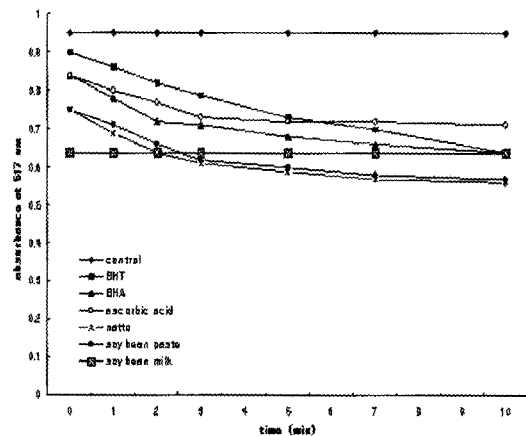


Fig. 3. Change of absorbance by the hydrogen donor properties of soybean products extracts and other antioxidants during the reaction with DPPH.

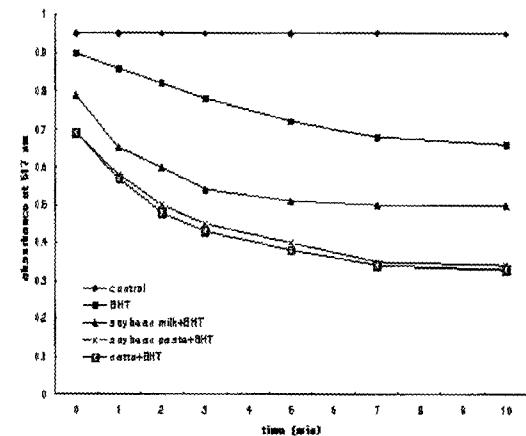


Fig. 4. Synergistic effect of soybean products extracts on the antioxidative activities of BHT.

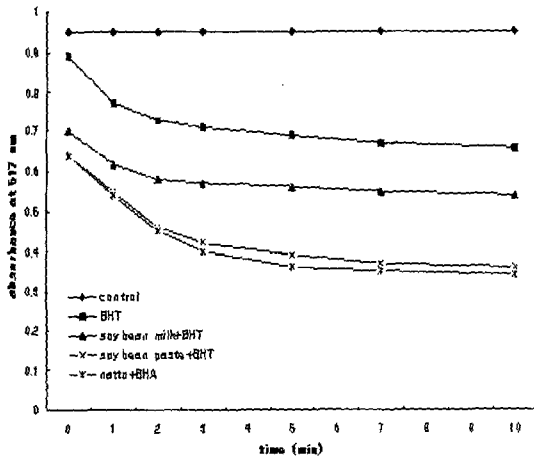


Fig. 5. Synergistic effect of soybean products extracts on the antioxidative activities of BHA.

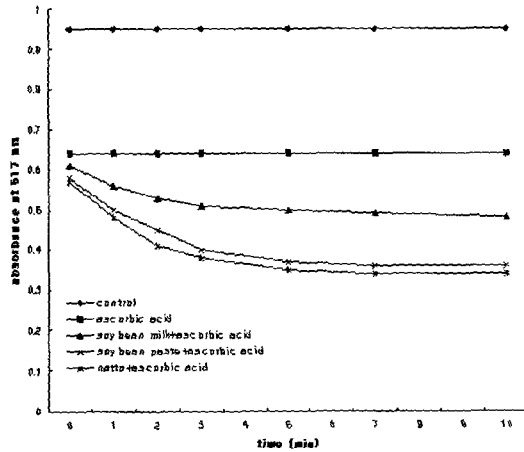


Fig. 6. Synergistic effect of soybean products extracts on the antioxidative activities of ascorbic acid.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 BHT에 콩 제품 추출물을 첨가한 후 상승효과를 실험한 결과, BHT에 콩 추출 화합물을 첨가한 모든 시험구에서 반응시간이 지남에 따라 지속적으로 감소하여 상승효과가 있었으며 된장과 청국장이 두유에 비하여 BHT과의 상승효과가 높은 것으로 나타났다. Fig. 5는 BHA와 콩 제품 추출물의 상승효과를 나타낸 결과로 BHA의 경우 10분 경과시 청국장, 된장 추출물을 첨가한 시험구가 약 2배가 더 강한 항산화능을 보였으며 된장과 청국장이 두유에 비하여 BHA와의 상승효과가 더 높은 것으로 나타났다. Fig. 6은 ascorbic acid와 콩 추출화합물과의 상승 효과를 나타낸 것으로 ascorbic acid는 반응시간이 경과하여도 수소 공여능은 일정하나 ascorbic acid에 콩 제품 추출물을 첨가한 시험구에서는 지속적으로 감소하여 상승효과가 있었다. 시판 항산화제와 콩 제품 추출물의 상승효과는 있었고, 그 순서는 청국장, 된장, 두유의 순으로 나타났다.

된장과 청국장, 두유 추출물의 DPPH 수소 공여능 측정 시

Table 1. The antioxidative activity by DPPH method on extracted soybean products extracts

Soybean products extracts	Inhibition (%)
Natto	42.60±0.16 <sup>1),a</sup>
Soybean paste	42.07±0.37 <sup>b</sup>
Soybean milk	27.33±0.16 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup> Each value represents an average±standard deviation from three trials. <sup>abc</sup> Means with different superscript in the same low significantly differ at p<0.05.

Table 2. The antioxidative activity extracted soybean products extracts

Soybean products extracts	Inhibition (%)
Natto	45.75±0.16 <sup>1),a</sup>
Soybean paste	45.23±0.27 <sup>b</sup>
Soybean milk	33.61±0.16 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup> Each value represents an average±standard deviation from three trials. <sup>abc</sup> Means with different superscript in the same low significantly differ at p<0.05.

반응시간 10분이 완료되었을 때의 O.D 값을 이용하여 억제율을 구하여 Table 1에 나타내었다. 청국장, 된장 추출물의 경우는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 억제율이 비슷하였으며, 두유의 경우는 청국장, 된장보다 억제율이 13% 정도 낮게 나타났다. 이는 발효제품에서의 aglycones의 함량이 비 발효 제품에서의 함량보다 발효미생물의 β-glucosidase 생성에 의해 높아 항산화력이 높은 것으로 추정된다.

### TBA radical scavenging activity

TBA 측정에 있어서 청국장 추출물의 억제율은 45.8%로 된장의 억제율 45.2%와 유의적 차이가 없었으며(p<0.05), 두유의 경우는 약 12% 정도 낮게 억제율이 나타났으며, 이는 DPPH 수소 공여능 측정 실험 결과와 유사하게 나타났다 (Table 2).

### 요 약

본 연구는 콩 제품 추출물의 항산화 활성을 DPPH 수소 공여 능으로 실험하고, 기존의 항산화제와의 상승효과 및 TBA radical scavenging activity를 실험하였고 그 결과는 다음과 같다. 콩 제품 추출물은 DPPH와 반응하여 시간이 경과함에 따라 감소하고, 시판 항산화제인 ascorbic acid는 반응 초기에 완료되는 결과를 보이는 반면 BHT와 BHA는 지속적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 콩 발효식품인 된장과

청국장 추출물이 비 발효식품인 두유 추출물에 비하여 감소폭이 다소 크게 차이가 나타났다. 콩제품 추출물과 시판 항산화제의 상승효과를 조사한 결과 모든 시험 구에서 반응시간이 경과함에 따라 감소폭이 증가하여 상승효과가 나타났으며 발효 식품인 된장과 청국장이 비 발효 식품인 두유에 비하여 시판 항산화제와의 상승효과를 더욱 강하게 나타내었다. 콩 제품 추출물의 TBA 측정을 조사한 결과, 청국장 추출물의 억제율은 45.8%, 된장 추출물의 억제율은 45.2%로 나타났고, 두유 추출물의 억제율은 이보다 약 12% 낮은 33.6%로 나타났다. 따라서 이들 추출물 중 두유 추출물은 기존의 이소플라본이 생체에 미치는 긍정적인 효과와 함께 이들 항산화제 기능을 축산식품에 응용 가능한 것으로 사료된다.

### 참고문헌

1. Branen, A. L. (1975) Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyl anisole and butylated hydroxyl toluene. *Am. J. Oil Chem. Soc.* **52**, 59-62.
2. Chi, Hee Youn (1999) The study of physical characteristics and antioxidative activity and isoflavones analysis on collected soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *J. Kor. Soc. of Med. Crop Sci.* **45(1)**, 26-28.
3. Choi, Y. B. and Sohn, H. S. (1998) Isoflavone content in Korean fermented and unfermented soybean foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 745-750.
4. Choi, Y. B., Woo, J. G., and Noh, W. S. (1999) Hydrolysis of  $\beta$ -glycosidic bonds of isoflavone conjugates in the lactic acid fermentation of soy milk. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**, 189-195.
5. Coward, L., Smith, M., Kirk, M., and Barnes, S. (1998) Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 1486S-1491S.
6. Esaki, H., Onozaki, H., Morimitsu, Y., Kawakishi, S., and Osawa, T. (1998) Potent antioxidative isoflavones isolates from soybeans fermented with *Aspergillus saitoi*. *Bio Sci. Biotechnol. and Biochem.* **62(4)**, 740-746.
7. Fukutake, M., Takahashi, M., Ishida, K., Kawamura, H., Sugimura, T., and Wakabayashi, K. (1996) Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. *Food and Chemical Toxicology* **34**, 457-461.
8. Low, G., S. H., and Custer, L. J. (1999) Isoflavone levels in soy foods consumed by multiclinic populations in Singapore and Hawaii. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 977-986.
9. Gyorgy, P., Murata, K., and Ikehara, H. (1964) Antioxidants isolated from fermented soybeans (Tempeh). *Nature* **203**, 870-872.
10. Ha, E. Y. W., Morr, C. V., and Seo, A. (1992) Isoflavone aglycones and volatile organic compounds in soybeans: effects of soaking treatment. *J. Food Sci.* **57**, 414-417.
11. Hahm, T. S., King, D. I., and Min, D. B. (1993) Food antioxidants research. *Food and Biotechnol.* **30(1)**, 14-21.
12. Halliwell, B. and Chirico, S. (1993) Lipid peroxidation : Its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**, 715S-717 S.
13. Harborne, J. R. (1994) The flavonoids: advances in research since 1986. Chapman and Hall, NY, pp. 676.
14. Izumi, T., Piskura, M. K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Kubota, Y., and Kikuchi, M. (2000) Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than glucosides in humans. *J. Nutr.* **13**, 1695-1699.
15. Lee, J. W., Do, J. H., and Shim, K. H. (1999) Antioxidant activity of the water soluble browning reaction products isolated from Korean Red Ginseng. *J. Ginseng Res.* **23(3)**, 176-181.
16. Kim, J. S. and Yoon, S. (1999) Isoflavone content and  $\beta$ -glucosidase activities of soybeans, meju, and doenjang. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**, 1405-1409.
17. Mahungu, S. M., Diaz-Mercado, S., Li, J., Schwenk, M., Singletary, K., and Faller, J. (1999) Stability of isoflavones during extrusion processing of corn/soy mixture. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 279-284.
18. Matsuura, M. and Obata, A. (1993)  $\beta$ -Glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. *J. Food Chem.* **58**, 144-147.
19. Reinli, K. and Block, G. (1996) Phytoestrogen content of foods - a compendium of literature values. *Nutr. Cancer* **26**, 123-148.
20. Reramoto, R., Y., Ohta, N., and Ueda, S. (1994) Solubilization of a novel isoflavone glycoside-hydrolyzing  $\beta$ -glucosidase from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnose*. *J. Ferment. Bioeng.* **77**, 493-441.
21. SAS (1988) SAS/STAT Software for PC. Release 6.03, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
22. Setchell, K. D. R., Brown, N. M., Desai, P., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B. E., Brashear, W. T., Kirschner, A. S., Cassidy, A., and Heubi, J. E. (2001) Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of com-

- mercial soy isoflavones supplements. *J. Nutr.* **131**, 1362S-1375S.
23. Shin, D. H. (1997) The trend and direction of natural antioxidants research. *Food Sci. and Industry* **30(1)**, 14-21.
24. Wang, H. J. and Murphy, P. A. (1994) Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1666-1673.
25. Wang, H. J. and Murphy, P. A. (1996) Mass balance study of isoflavones during soybean processing. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2377-2383.
26. Williamson, G., Plumb, G. W., Uda, Y., Price, K. R., and Rhides, M. J. C. (1996) Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in Hepa2c12 cells. *Carcinogenesis* **17**, 2358-2387.
27. Wu, J. (1994) Isoflavone content in isolated soy protein products. MS. thesis, Univ. of Illinois, Urbana, IL.
- 

(2004. 10. 25. 접수 ; 2004. 12. 16. 채택)