

양조간장으로부터 항산화성 물질의 분리 및 그 특성

문갑순·최홍식*

인제대학교 식품영양학과, *부산대학교 식품영양학과

Separation and Characteristics of Antioxidative Substances in Fermented Soybean Sauce

Gab-Soon Moon and Hong-Sik Cheigh*

Department of Food and Nutrition, Inje University, Kimhae

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

Abstract

Fermented soybean sauce was fractionated by gel filtration chromatography and the physico-chemical properties of each fraction were investigated for the study on the separation and characteristics of antioxidative substances in the soybean sauce. The brown coloured melanoidin fractions(MF-I) collected by Sephadex G-10 column were found to contain nitrogeneous compounds and to have strong antioxidative activity and reducing power. The freeze dried MF-I was further fractionated with Sephadex G-50 and G-100 successively and then MF-II and MF-III fractions were observed to be the most effective antioxidant and reducing power among the fractions. The UV-VIS and IR absorption spectra of the each fraction were also determined and discussed.

Key words : fermented soybean sauce, antioxidative activity, melanoidin, fractionation, reducing power

서 론

前報^(1,2)에서 보고한 바와 같이 양조간장은 加熱牛肉脂肪質의 산화에 대해 강력한 항산화 작용을 나타내었다. 항산화 작용의 원인 물질로서는 원료 대두 및 소맥에서 용출된 페놀화합물⁽³⁾과 마이아르 반응에 의하여 형성된 멜라노이딘⁽²⁾ 및 원료 단백질과 탄수화물들의 분해에 의해 생성된 여러 성분들을 생각할 수 있다. 그 중 간장 중의 멜라노이딘 물질이 가장 유력한 항산화물질로 추정되었다⁽²⁾. 그러나 양조간장의 갈색물질 및 기타 성분들을 분획, 분리하여 그 획분들의 항산화관련 특성을 살펴본 연구는 거의 없는 듯하다.

한편, 갈색물질인 마이아르 반응 생성물의 분리, 정제와 관련하여 Yamaguchi와 Fwjmaki⁽⁴⁾는 Sephadex G-15와 20을 사용, 겔여과 크로마토그래피에 의해 갈변반응 물질을 멜라노이딘과 reductone으로 분획한 바 있다. 그리고 Kirigaya 등⁽⁵⁾은 투석과 겔여과 방법을 통해 갈변반응물질을 저분자와 고분자물질로 구분하였으며 Yamaguchi 등⁽⁶⁾은 Sephadex G-15, 50, 100을 이용하여

갈변반응물질에서 가장 항산화성이 큰 부분을 분리, 정제하고 타항산화제들과 항산화력을 비교한 바 있다.

본 연구에서는 양조간장의 항산화관련 성분들을 겔여과 크로마토그래피에 의해 분획하고 그 특성을 살펴본 것으로 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

양조간장의 조제

양조간장의 조제방법은 전보⁽²⁾의 방법에 따랐으며 6개월간 숙성시킨 것을 시료로 하였다.

Sephadex G-10, G-50 및 G-100에 의한 겔여과 크로마토그래피

Sephadex G-10(Fine, Sigma Chem. Co., USA)을 column(2.5×40 cm)에 충전시킨 후 양조간장 1 ml를 주입하여 유출시켰다. 이 때, 유속은 1 ml/min이었으며 용리액은 물이었고, 3.5 ml씩 분취하였다. 다음, Sephadex G-50에 의한 겔여과는 Sephadex G-50(Fine, Sigma Chem. Co., USA)을 column(2.5×40 cm)에 충전시킨 후 Sephadex G-10에서 항산화력이 가장 컸던 부분(획분 11 및 12)을 동결 건조시켜 시료 100 mg을 물 1 ml에

Corresponding author : Gab-Soon Moon, Department of Food and Nutrition, Inje University, 18-3, Ubang-dong, Kimhae-city, Kyungsang Nam-Do 621-749

용해한 후 유출시켰다. 용리액, 유속 및 분취량은 Sephadex G-10에서와 동일하게 하였다. 그리고 Sephadex G-100에 의한 겔여과는 Sephadex G-100(Fine, Sigma Chem. Co., USA)을 충전한 column(2.5×40 cm)에 Sephadex G-50 겔여과에서 얻어진 항산화력이 가장 큰 부분(획분 26, 27, 28)을 동결 건조시켜 상기와 같은 조건하에서 유출, 분취하였다.

갈색도 및 환원력의 측정

각 column에서 분획된 획분의 갈색도는 420 nm에서의 흡광도로 나타내었다. 그리고 환원력은 Somogi-Nelson 법에 의하여 540 nm에서의 흡광도로 나타내었다⁽⁷⁾.

Ninhydrin 반응 양성물질 및 항산화능의 측정

Ninhydrin 반응 양성물질의 측정은 1% ninhydrin용액 1 ml와 각 획분 1 ml를 혼합하여 100°C에서 30분간 가열시킨 후 냉수에서 냉각시켜 570 nm에서의 흡광도를 측정하여 표시하였다. 그리고 항산화능의 측정은 Hayase와 Kato의 방법⁽⁸⁾에 따라 과산화물가를 구하여 표시하였다.

UN-VIS 및 IR 흡수 Spectra의 측정

분리된 획분의 UV-VIS 흡수 Spectra는 UV-VIS Spectrophotometer(Hitachi 200-20, Japan)를 이용하여 측정하였으며, 측정조건은 20 mV, scanning rate는 60 nm/min, slit 120 mm/min이었다. 그리고 IR 흡수 spectra는 IR spectrophotometer(Hitachi, 260-30, Japan)를 이용하여, 미리 동결 건조시킨 시료 2 mg을 KBr 200 mg에 섞어 정제 형성 후 측정하였다.

결과 및 고찰

Sephadex G-10을 이용한 양조간장의 항산화성 물질의 분리 및 특성

Sephadex G-10을 충전한 column에 양조간장을 유출시킨 후 각 획분에 대한 갈색도, 환원력, ninhydrin 반응 양성물질 및 과산화물가를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 대부분의 갈색물질은 11, 12, 13획분에서 유출되었고 환원력은 12에서 17사이의 획분에서 매우 높았으며 ninhydrin 양성반응물질은 12에서 20사이의 획분에서 대단히 높았다. 또한 항산화능은 갈색도와 일치하여 갈색도가 가장 높은 획분 11에서 가장 높았고 갈색도가 낮아짐에 따라 항산화능도 낮아짐을 알 수 있었다. 이는 유⁽⁹⁾의 고분자물질의 멜라노이딘에서 항산화력이 강하게 나타난다고 한 바와 일치함을 알 수 있었다.

한편, Kirigaya 등⁽¹⁰⁾은 멜라노이딘은 reductone 구조

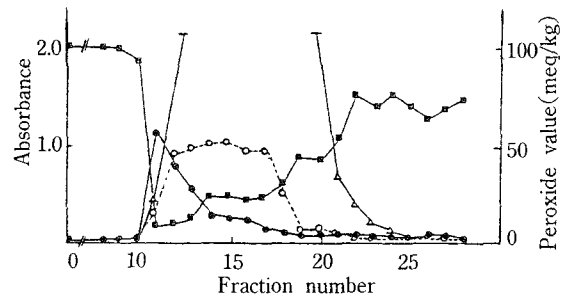


Fig. 1. Elution profile of soybean sauce fractionated on a Sephadex G-10 column with distilled water. Eluent was collected in 3.5 ml aliquots and tested for color intensity(420 nm; -●-), reducing power(540 nm; -○-), ninhydrin positive substance(570 nm; -△-) and peroxide value(-■-). And then fractions of number 11 and 12 were collected as a melanoidin fraction(MF-I).

를 가지며, 멜라노이딘과 reductone의 생성량은 비례한다고 하였으나 양조간장의 환원력은 갈색도와 반드시 일치하지 않아서 갈색도가 강한 획분의 환원력도 높았으나 간장의 갈색도가 낮은 획분 14이하에서도 강한 환원력을 지속적으로 나타내어 저분자의 멜라노이딘도 강한 환원력을 가지고 있음을 알 수 있었다. 한편, Lundberg는 멜라노이딘의 reductone 구조는 수소이온을 과산화수소 라디칼로 옮김으로써 radical chain을 절단하여 유독기를 증가시키므로 항산화효과를 나타낸다고 설명한 바 있다⁽¹¹⁾.

Ninhydrin반응 양성물질은 멜라노이딘이 검출되기 시작하는 획분 11에서부터 높아지기 시작하여 21번까지 매우 높은 값을 나타내었는데, 앞부분의 ninhydrin반응 양성물질은 멜라노이딘의 질소화합물에서 유래된 것으로 추정되며 뒷 부분의 높은 양성반응물질은 저분자의 펩티드 및 아미노산에서 유래되는 것으로 추정된다. Yamaguchi와 Fujimaki는 멜라노이딘에 질소함유량이 많으면 항산화성도 커지고, 칼라멜 색소에는 항산화성이 없는 점에서 멜라노이딘 색소성분의 항산화성의 발현에는 질소원자가 관여하고 있다는 사실을 밝힌 바 있고⁽¹²⁾, 본 결과에서도 간장의 멜라노이딘 성분에서 상당한 ninhydrin반응 양성물질이 있음을 알 수 있었다.

본 실험의 결과 갈색도와 항산화성이 일치하고 있음을 알 수 있었고 항산화성이 가장 큰 멜라노이딘이 환원성이 있었으며 아울러 ninhydrin반응 양성물질임을 알 수 있었으나 항산화성과 환원력, ninhydrin반응 양성물질과 일치하지는 않았다. 그리고 항산화력이 가장 강한 획분 11 및 12를 반복하여 모아 멜라노이딘 획분(MF-I)으로 분획하여 다음 실험에 이용하였다.

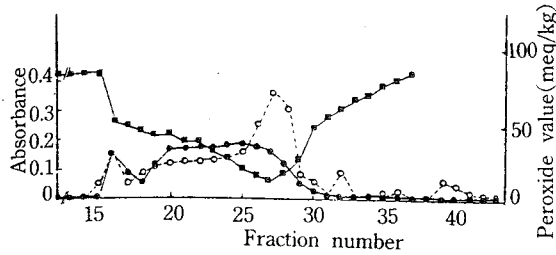


Fig. 2. Elution profile of MF-I(See Fig. 1) fractionated on a Sephadex G-50 with distilled water

Freeze dried MF-I(100 mg) was dissolved in distilled water(1 ml) and used for fractionation. Elution and tests were conducted as shown in Fig. 1. The fractions(Number 26, 27 and 28) were collected as a MF-II and used for the further fractionation.

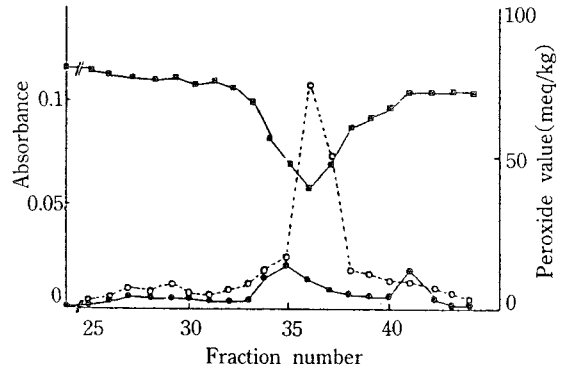


Fig. 3. Elution profile of MF-II(See Fig. 2) fractionated on a Sephadex G-100 with distilled water

Elution and tests were conducted as shown in Fig. 2 and then the fractions(Number 36) were collected as a MF-III

Sephadex G-50에 의한 항산화성 물질의 재분리 및 특성

Sephadex G-10에서 항산화력이 가장 강한 MF-I 획분을 동결 건조시켜 이를 Sephadex G-50을 충전한 column에 재분획하여 갈색도, 환원력 및 과산화물가를 측정 한 결과는 Fig. 2와 같다.

갈색물질은 광범위한 영역에서 유출되었고 갈색물질이 유출되는 획분의 환원력도 비례적으로 높았으나 저분자의 멜라노이딘 영역에서 가장 높은 값을 나타내었다. 과산화물가는 환원력과 반비례하여 저분자의 멜라노이딘 부분에서 가장 낮은 값을 나타내었다. 따라서 저분자의 멜라노이딘이 강한 환원력을 가지고 있으며 그 항산화효력은 환원력과 일치하고 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Yanaguchi 등이 Sephadex를 이용한 겔여과 방법이나⁽⁶⁾, Kirigaya 등이 DEAE-cellulose 크로마토그래피로 멜라노이딘을 분리한 결과 저분자의 멜라노이딘 부분에서 항산화효과가 높았다는 점⁽⁵⁾과 일치하고 있었다. 그리고 본 분획과정에서 가장 항산화력이 높았던 획분 26, 27, 28을 반복하여 모아 MF-II 획분으로 분리하였고 이를 재분획하는데 사용하였다.

Sephadex G-100을 이용한 항산화성 물질의 재분리 및 특성

Sephadex G-50에서 가장 항산화력이 높았던 획분인 MF-II를 동결 건조시켜 Sephadex G-100으로 재분획하여 갈색도, 환원력 및 과산화물가를 측정 한 결과는 Fig. 3과 같다.

갈색물질은 획분 34에서 41에 걸쳐 유출되었으나 갈색도는 상대적으로 낮았다. 환원력은 획분 36에서 매우 높게 나타났고 이 부분의 항산화효력 또한 가장 높아 양조간장의 항산화력을 나타내는 물질은 획분 36부근에서 집중적으로 검출됨을 알 수 있었고 이 항산화력은

환원력과 밀접한 관계를 가지고 있는 저분자의 멜라노이딘 색소성분으로 추정되었다. 그러나 항산화효력의 면에서 Sephadex G-50, G-100으로 재분리 할수록 과산화물가가 높아졌고, 특히 G-100으로 재분리하였을 때는 획분 36에서도 높은 과산화물가를 나타내어 멜라노이딘의 경우 Sephadex를 이용한 겔여과를 되풀이하여 분자 크기에 따른 항산화효과를 비교할 수는 있으나 항산화효력이 가장 큰 획분을 수집할 수 없다는 점을 알 수 있었다. 그것은 멜라노이딘이 분자 크기별로 넓은 범위로 분획되면서 항산화효과 또한 분산되기 때문으로 생각되었다.

분획물질의 UV-VIS 및 IR Spectra의 특성

양조간장의 항산화성 관련 물질의 이화학적 특성을 알아보기 위하여 양조간장과 Sephadex G-10, 50, 100에서 분획한 항산화효력이 가장 큰 획분들(MF-I, MF-II, MF-III)의 UV-VIS 및 IR 흡수 spectra를 Fig. 4~6에 나타내었다.

양조간장의 획분별 UV-VIS 흡수 spectra(Fig. 4)에 있어서 항산화력이 가장 큰 획분 11은 최대흡수대를 갖지 않는 완만한 흡수곡선을 나타낸 반면, 획분 30은 270 nm부근에서, 그리고 획분 50은 220 및 270 nm부근에서 각각 특징적인 최대 흡수대를 나타내었고 획분 70은 거의 흡수곡선을 나타내지 않고 있었다. 그리고 Sephadex G-10, 50, 100에서 분리한 항산화효력이 큰 획분인 MF-I, MF-II 및 MF-III의 흡수 패턴(Fig. 5)은 모두 멜라노이딘 색소 특유의 패턴을 나타내어 260~320 nm에 걸쳐 완만한 흡수곡선을 나타내었는데 특히, Sephadex G-10에서 분획한 MF-I 획분의 흡수 spectrum은 model system을 이용해 만든 멜라노이딘⁽⁹⁾, 인삼 갈변물질의 멜

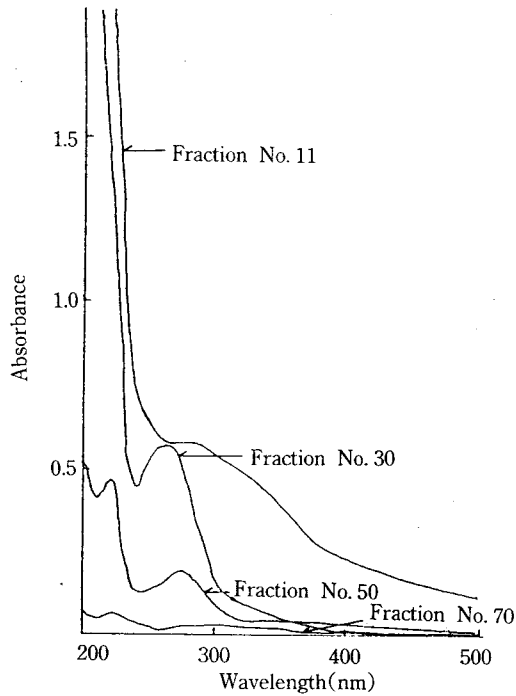


Fig. 4. UV-VIS spectra of soybean sauce fractionated by Sephadex G-10 column

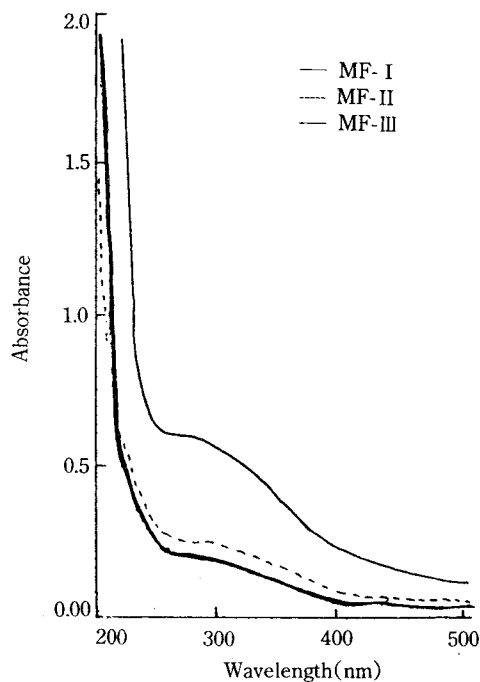


Fig. 5. UV-VIS spectra of melanoidin(MF-I, MF-II and MF-III) fractionated with Sephadex G-10, G-50 and G-100 column(See Fig.1,2 and 3)

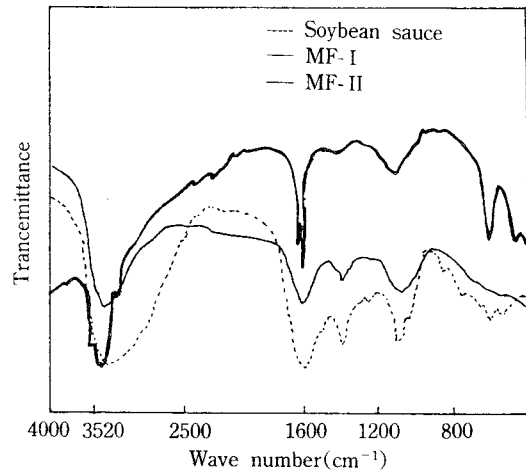


Fig. 6. IR spectra of soybean sauce and melanoidin (MF-I and MF-II) fractionated with Sephadex G-10 and G-50(See Fig.1 and 2)

라노이드⁽⁷⁾, 간장의 갈색성분⁽¹³⁾에 대한 spectrum과 대단히 유사한 패턴을 나타내었다.

양조간장과 Sephadex G-10 및 G-50에서 겔여과한 항산화효력이 가장 큰획분인 MF-I 및 MF-II를 양조간장과 함께 IR 흡수 spectra를 비교해 본 결과(Fig. 6), 각 spectra의 모양이 약간씩 다르기는 하나 특징적인 흡수곡선은 대단히 유사하게 나타나서 3400 cm⁻¹과 1620, 1410 그리고 1080 cm⁻¹ 부근에서 강한 흡수를 나타내었다. 3400 cm⁻¹은 OH기에 의한 흡수대이며 1600 cm⁻¹은 지방족 제1급 아민의 특징적인 흡수대이며, 1400 cm⁻¹은 -CH₂-CH₂-의 흡수대이며, 1080 cm⁻¹은 -CO의 구조 때문으로 추정되었다.

Maruyama 등에 의하면 산화지질에 아미노산과 당을 가하여 만든 항산화성 갈변물질도 OH에 의한 흡수가 크다고 하였고⁽¹⁴⁾, Thumann과 Herrmann은 hydroxycinnamic acid와 hydroxybenzoic acid와 같은 페놀화합물이 항산화효과가 있는 것은 OH기에 의한 것이라고 보고하고 있다⁽¹⁵⁾. 또한 아미노산 화합물의 항산화성에 대하여 Adamic 등은 아민화합물의 항산화성은 아미노기가 peroxy radical과 반응하여 안정한 화합물을 형성하기 때문이라고 하였으며⁽¹⁶⁾ Totani 등은 hydroxy amine이 과산화물을 감소시키는 것은 아미노기와 과산화물과의 반응에 의한 것이라고 보고한 바 있다⁽¹⁷⁾. 따라서 양조간장 및 간장 갈변물질의 항산화성은 OH기, 아민기 등의 구조에 기인하는 것으로 추정된다.

요 약

양조간장 중의 항산화효력을 가진 물질을 분리하고

그 특성을 알기위하여 Sephadex G-10, 50, 100을 이용하여 양조간장을 겔여과하고 각 획분에 대한 항산화성과 관련된 특성을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 양조간장을 Sephadex G-10에서 분획한 결과 갈색도가 가장 높은 멜라노이딘 획분(MF-I)에서 항산화효력이 가장 컸고, 이 부분은 질소를 함유하고 있었으며 환원력이 매우 큰 물질이었다. Sephadex G-10에서 항산화효력이 가장 큰 MF-I을 동결 건조하여 Sephadex G-50에서 재분획 한 결과, 갈색물질은 광범위한 범위에서 분획되었고 저분자의 멜라노이딘 부분(MF-II)에서 항산화성 및 환원력이 가장 크게 나타났다. 이 MF-II 획분을 다시 Sephadex G-100에서 재분획하여 항산화효력이 비교적 크고 환원력이 매우 큰 한 획분(MF-III)을 분리하였으나 환원력을 제외한 갈색도 및 항산화력은 상대적으로 낮았다. 그리고 양조간장의 항산화성 관련 물질의 구조적 특성을 알아보기 위해 분리한 각 획분의 UV-VIS 및 IR spectra를 측정한 결과 항산화성이 큰 각 획분(MF-I, MF-II 및 MF-III)의 UV-VIS spectra는 260~320 nm에서 완만한 peak를 나타내는 전형적인 멜라노이딘의 특성을 나타내었다. 그리고 IR spectra의 경우 특징적인 OH기 및 amine기 구조를 지니고 있었고 이들이 항산화성을 갖는 기능기로 추정되었다.

문 헌

1. 문갑순, 최홍식 : 우육(牛肉) 지방질의 산화(酸化)에 미치는 간장의 항산화작용에 관한 연구. 한국식품과학회지, 18, 313(1986)
2. 문갑순, 최홍식 : 양조간장의 항산화작용 및 항산화성 물질에 관한 연구. 한국식품과학회지, 19, 537(1987)
3. Hayes, R.E., Bookwalter, G.N. and Bagley, E.B. : Antioxidant activity of soybean flour and derivatives. *J. Food Sci.*, 42, 1527(1977)
4. Yamaguchi, N. and Fujimaki, M. : Studies on browning reaction products from reducing sugars and amino acids, Part 10, Fractionation of browning reaction products on a antioxidative activities of browning reaction products between D-xylose and L-amino acids or amines during storage. *J. Food Sci. and Technol. (Japan)*, 20, 485(1973)
5. Kirigaya, N., Kato, H. and Fujimaki, M. : Studies on antioxidant activity of nonenzymatic browning reaction products, Part 3, Fractionation of browning reaction solution between ammonia and D-glucose and antioxidant activity of resulting fractions. *J. Agric. Chem. Soc. (Japan)*, 45, 292(1971)
6. Yamaguchi, N., Koyama, Y. and Fujimaki, M. : Fractionation and antioxidative activity of browning reaction products between D-xylose and glycine. In *Millard reactions in food*, Eriksson, C.(ed), Pergamon Press, Oxford, p.429(1981)
7. 김상달, 도제호, 오훈이 : 고려인삼 갈변물질의 항산화 효과. 한국농화학회지, 24, 161(1981)
8. Hayase, F. and Kato, H. : Antiooxidative components of sweet potatoes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 30, 37 (1984)
9. 유병진 : Amino 산-Xylose 갈변반응 물질의 항산화성. 수산대학 박사학위논문(1985)
10. Kirigaya, N., Nato, H. and Fujimaki, M. : Studies on antioxidant of nonenzymatic browning products, Part 1, Relations of color intensity and reductones with antioxidant activity of browning reaction products. *Agric. Biol. Chem.*, 32, 28(1968)
11. Lundberg, W.O. : *Autoxidation and antioxidants*, John Wiley and Sons, Inc.(1961)
12. Yamaguchi, N. and Fujimaki, M. : Studies on browning reaction products from reducing sugars and amino acids, Part 14, Antiooxidative activities of purified melanoidin and their comparision with those of legal antioxidants. *J. Food Sci. and Technol. (Japan)*, 21, 6(1974)
13. Motai, H. and Inoue, S. : Oxidative browning in color of shoyu. *J. Agric. Chem. Soc. (Japan)*, 48, 329 (1974)
14. Maruyama, M., Fujimoto, K. and Kaneda, T. : Antioxidative activity of browning products derived from autoxidized oil, Part 1, Comparision of antioxidative activity in several model system. *J. Food Sci. and Technol. (Japan)*, 17, 281(1970)
15. Thumann, V.I. and Herrmann, K. : Über die antioxi-dative wirkung von hydroxizimtsäuren und hydroxi-benzoessäuren. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 76, 344(1980)
16. Adamic, K., Bowman D.F. and Ingold, K.U. : The inhibition of autoxidation by aromatic amines. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 47, 109(1970)
17. Totani, N., Nagayama, Y., Totani, Y. and Matuo, N. : Decrease in the hydroxide of fatty acid ester caused by amines. *J. Japan Soc. Food and Nutr.*, 28, 485 (1975)

(1990년 5월 14일 접수)