

청국장 발효기간에 따른 *trans*-Resveratrol과 비소화성 올리고당의 변화 및 항산화활성

최명효[†] · 조계만 · 남상해
경남과학기술대학교 식품과학부

Antioxidant Activities and Changes in *trans*-Resveratrol and Indigestible Oligosaccharides according to Fermentation Periods in *Cheonggukjang*

Myounghyo Choi[†], Kyeman Cho, and Sanghae Nam

Div. of Food Science, Gyeongnam National University of Science
and Technology, Gyeongnam 660-758, Korea

ABSTRACT *Cheonggukjang* was manufactured using three different kinds of soybeans, after which changes in the content of phytoalexins such as *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene) were measured. Along with phytoalexins, changes in the content of functional oligosaccharides such as stachyose and raffinose were also measured, and the corresponding antioxidant activities were studied. The content of *trans*-resveratrol was found to be higher in fermented beans than in raw beans. Generally, the content was higher as the fermentation period increased. After 48 hours of fermentation, the contents of *trans*-resveratrol were 50.06±0.82, 39.04±0.49, and 34.00±0.54 µg/g (Nulchan, Daewon, and Taekwang), respectively, which is 4 times higher than the contents of raw beans. The contents of stachyose were 10.84±0.42~13.05±0.13 mg/g in raw beans, 11.37±0.03~12.05±0.52 mg/g immediately after boiling, and 0.16±0.01~0.33±0.02 mg/g after 12 hours of fermentation, which is a 97% decrease from those of raw beans. After 24 hours of fermentation, no amount of stachyose was detected. The contents of raffinose were the lowest in raw beans at 2.66±0.09~3.54±0.05 mg/g, but they increased 3~4 times between boiling and 24 hours of fermentation to 10.61±0.16~12.66±0.17 mg/g. However, raffinose content tended to decrease to 8.28±0.17~11.83±0.44 mg/g after 48 hours of fermentation. From FRAP, DPPH, and ABTS assays, antioxidant activities according to fermentation period of *Cheonggukjang* were rather low in boiled soybeans compare to raw soybeans. However, the activities were higher as the fermentation period increased. The antioxidant activity of *trans*-resveratrol showed an RC₅₀ value of 4.71±0.36~8.46±0.05 µg/mL from the DPPH, ABTS, and FRAP assays. This could be partly due to the significant increase in *trans*-resveratrol according to fermentation periods. However, changes in functional oligosaccharides (stachyose and raffinose) during fermentation appear to not be related to the antioxidant effects of *Cheonggukjang*.

Key words: *Cheonggukjang*, *trans*-resveratrol, stachyose, raffinose, antioxidant

서 론

콩에는 양질의 단백질과 식이섬유가 풍부하고 이소플라본, 사포닌, 레시틴 등의 기능성 항산화 물질을 많이 함유하고 있으며, 특히 40% 이상을 차지하는 단백질은 필수아미노산이 고르게 함유되어 있어 불포화도가 높은 지방, 탄수화물 및 비타민, 미네랄 등의 미량 영양성분을 고루 갖춘 식품이다(1).

콩으로 만드는 청국장은 *Bacillus* sp.를 이용하여 발효되는 한국 고유의 전통발효식품으로 다른 장류에 비해 발효기간이 2~3일 정도로 매우 짧은 특징이 있다. 발효 과정 중에

고초균이 생산하는 효소류에 의해 원료 콩의 당질과 단백질 등이 분해되어 독특한 풍미와 alkyl pyrazine, 암모니아 화합물 및 합황 화합물 등의 생성으로 고유취를 내고, levan form fructan과 polyglutamate의 혼합물인 점질물을 다량 생성하여 특유의 점질성, 조직감을 지닌다(2,3). 또한 청국장 발효 과정 중 콩 속에 함유되어 있는 isoflavone 및 유용성분의 배당체가 당이 떨어지는 aglycone 형태로 변화하여 콩 자체보다 높은 생리활성을 나타내며(4), 이러한 청국장은 콩 원료의 영양소 이외에도 식이섬유, 인지질, isoflavone, phenolic acid, saponins, trypsin inhibitor, phytic acid 등을 포함하고, vitamin, mineral, 필수 아미노산 등의 필수 영양소 및 유용성분이 다량 함유되어 있어 콜레스테롤 저하, 고혈압 예방, 항암, 간 기능 개선, 항산화 및 혈전 용해 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다(5-9). 청국장에 관한 연구로는 향기성분 변화(2), 점질물 생산(3), 항산화 및

Received 10 October 2013; Accepted 20 December 2013

[†]Corresponding author.

E-mail: cmh840328@naver.com, Phone: +82-55-751-3274

혈전용해 활성(9), 이화학적 특성(10) 등이 보고되어 있다.

trans-Resveratrol(3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene)과 유도체인 viniferin은 포도나 포도주와 같이 여러 가지 관련 생산물에 존재하는 천연 phenolic 성분으로 *trans*-resveratrol은 1992년 Siemann 및 Creasy에 의해 포도주에서 처음 발견되었으며, Lee 등(11)은 땅콩에서도 품종별, 성장시기별로 그 함량을 조사한 바가 있다. Resveratrol은 *trans*-, *cis*- 형태 및 배당체인 *picid*- 형태로 존재하며, *trans*-resveratrol은 자외선에 의하여 *cis*-resveratrol로 쉽게 변환다(12). *trans*-Resveratrol은 UV 조사, 금속이온 혹은 *Botrytis cinerea*나 *Plasmopara viticola*에 의한 감염 등 생물학적 또는 비생물학적 스트레스에 대해 자신을 방어하기 위하여 몇 가지 식물에서 생성되는 항독성 물질(stilbene phytoalexin)로서(13,14) 땅콩(11), 포도(15), 오디(16) 등에 함유되어 있으며, 포도와 꽃감의 외면에 흰색 가루 형태로 존재한다. *trans*-Resveratrol의 기능은 지방 과산화 억제 및 free radical 소거 기능과 같은 항산화 작용, cyclooxygenase 저해 등의 항염증 작용, 혈소판 응집 억제 및 심혈관계질환 방지, 암세포 성장 억제 및 암 예방 효능 등의 다양한 생리활성을 갖는 것으로 알려져 있다(17-20). *trans*-Resveratrol에 관한 연구로는 땅콩 품종 및 생육기별 *trans*-resveratrol 함량(11), 포도의 품종 및 부위별 resveratrol 함량(15), 뽕나무 계통별 오디의 resveratrol 함량(16) 등의 연구가 보고되어 있다.

대두 올리고당은 대두에 함유되어 있는 수용성 소당류의 총칭으로 주로 stachyose, raffinose, sucrose 등으로 구성되어 있다. 이 중 stachyose는 약 4%, raffinose는 약 1%가 함유되어 있으며, sucrose에 galactose가 α -1,6 결합으로 각각 1, 2개 결합이 되어 있는 화학구조를 가지고 있어 인체의 효소에 의해 분해가 되지 않는 난소화성 올리고당으로 미숙기에는 거의 없다가 성숙기에 급속히 증가한다. 대두 올리고당은 식이섬유소와 함께 장내에서 비타민 합성을 촉진하며, 유해균 및 외부 침입균의 증식을 억제하고 암모니아와 아민의 생성을 억제한다. 또한 면역기능을 강화하고 장관의 연동운동을 촉진함으로써 항염증 작용을 하며, 소화와 흡수를 촉진하는 유용균인 비피도박테리아의 성장 촉진인자로써 작용한다. 비피도스균은 유산과 아세트산을 생성하여 장내 pH를 낮추어 장내 유해균의 증식을 억제하며, 장운동을 증진시켜 변비를 개선하고 장 부위의 기능저하를 방지하는 역할을 한다. 또한 장내 유해물인 암모니아, H₂S 등의 흡수를 방지하고, 부패균에 의하여 생성되는 발암물질인 인돌(indole), 스카톨(scato), 페놀(phenol) 등의 생성을 억제하는 기능이 있어 기능성 식품소재로 활용도가 높다(21-23).

청국장의 항산화효과에 관한 연구로는 대두와 청국장 추출물의 항산화효과(9), 분말청국장에서 알코올로 추출한 물질의 항산화효과(24), 검은콩의 품종에 따른 콩과 청국장 추출물의 항산화효과(25) 등이 연구되어 있다. 본 연구에서는 3품종의 콩을 이용하여 청국장의 발효기간에 따른 *trans*-

resveratrol과 몇 종의 indigestible oligosaccharides의 함량 변화를 조사하고, 이에 따른 항산화활성의 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 청국장 제조

본 실험에 사용한 시료는 농촌진흥청 국립식량과학원 기능성작물부에서 제공받은 대원(Daewon), 늘찬(Nulchan), 태광(Taekwang) 등 3품종의 콩이었다. 청국장의 제조는 각각의 콩을 12시간 동안 물에 불린 후 121°C에서 30분간 삶아 물기를 제거한 다음 *Bacillus subtilis* CSY191 균(26) 배양액을 2.5 mL 접종하고 37°C에서 발효시키면서 12, 24, 48 hr에 시료를 채취하여 동결건조 하였으며, 실험에 사용할 때까지 -20°C의 냉동고에 보관하였다.

시약 및 기기

본 실험에 사용한 시약은 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH), 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(ABTS), *trans*-resveratrol, iron(III) chloride, 5-sulfosalicylic acid(5-SSA), potassium persulfate, α -tocopherol은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Stachyose, butylated hydroxy toluene(BHT)은 Aldrich Chemical Co.(Milwaukee, WI, USA)로부터 구입하였으며, raffinose는 Fluka Chemie AG(Buchs, Switzerland)로부터 구입하였다. HPLC 분석용 용매로는 acetonitrile, methanol, ethanol 및 water는 Fisher scientific Korea Ltd.(Seoul, Korea)에서 구입하였다. Glacial acetic acid, acetone은 J. T. Baker Chemical Co.(Phillipsburg, NJ, USA)로부터 구입하였다.

본 실험에 사용한 기기는 HPLC(Agilent 1260, Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA), liquid chromatograph(LC-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan), microplate reader(EL800, BioTek, Winooski, PA, USA)를 사용하여 분석하였다.

trans-Resveratrol 함량 분석

각각의 청국장 분말 2 g(dry weight)을 methanol/water(80:20, v/v) 용액 10 mL를 가하여 45°C의 어두운 곳에서 45분간 교반하여 추출하였으며, 추출액은 원심분리기(HA-1000-3, Hanil, Seoul, Korea)를 이용하여 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하고, 상침액을 취하여 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 Lee 등(11)의 방법에 따라 HPLC로서 분석하였다. Analytical column은 Waters μ -Bondapak™ C₁₈(3.9×300 mm, 125Å, Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였고, elution solvent는 (A) glacial acetic acid : deionized water(52.6:900)와 (B) acetonitrile : so-

lution A(80:20)를 시간에 따라 gradient로 용리하여 분석하였다. 이동상의 속도는 0.8 mL/min, 시료 주입량은 10 μ L, UV 검출기의 파장은 306 nm에서 검출하였다.

Stachyose 및 raffinose 분석

각각의 청국장 분말 200 mg에 3 mL의 acetone을 가하고 2시간 동안 60°C의 water bath에서 환류한 후 원심분리(2,000 rpm, 5 min) 하고 침전물을 취함으로써 지방질을 제거하였다. 이 침전물을 약 60°C의 heating block에 꽂아 두어 남은 유기용매를 완전히 제거하였다. 이어서 1.9 mL의 3차 증류수를 가하고 60°C의 water bath에 2시간 동안 담가 둔 후에 0.1 mL의 1 M 5-SSA를 가하고 4°C 냉장고에 12시간 이상 넣어두었다. 이어서 원심분리(3,000 rpm, 5 min) 하여 침전물을 버리고 상정액을 취하였다. 이 상정액에 동량의 3차 증류수를 더 가한 후에 다시 원심분리(12,000 rpm, 10 min) 하였으며, 상정액을 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 HPLC로서 분석하였다. 올리고당의 분석을 위한 analytical column은 Supelcogel C-610H(7.8 \times 300 mm, Supelco, Bellefonte, PA, USA), 이동상은 0.1% phosphoric acid, 이동상의 속도는 0.6 mL/min, 검출기는 RID(reflective index detector), column 온도는 30°C이었다.

Ferric reducing antioxidant power(FRAP) 측정

FRAP 실험은 Benzie와 Strain(27)의 방법을 96 well에 따라 측정하였다. Reaction solution은 300 mM acetate buffer(pH 3.6), 40 mM HCl에 녹인 10 mM TPTZ 및 20 mM iron(III) chloride를 10:1:1로 실험직전에 만들어 사용하였다. 반응액 200 μ L와 농도별로 희석된 시료 50 μ L를 혼합한 후 37°C에서 15분간 반응시킨 후 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 FRAP 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC₅₀ 값으로 나타내었다.

DPPH free radical scavenging 활성 측정

DPPH free radical scavenging 활성 측정은 Joo와 Park (9)의 방법을 변형하여 실험하였다. 청국장 추출물을 농도별(1,000, 500, 100, 10, 1 및 0.1 μ g/mL)로 methanol에 희석한 용액 100 μ L와 0.2 mM DPPH를 200 μ L 넣고 혼합하여 30분 동안 반응시킨 후 microplate reader(BioTek)를 사용

하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 DPPH 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC₅₀ 값으로 나타내었다.

ABTS cation radical scavenging 활성 측정

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS cation decolorization assay 방법(28)을 수정하여 실시하였다. 7 mM ABTS 용액과 2.45 mM potassium persulfate를 최종 농도로 혼합하여 실온 어두운 곳에서 24시간 방치하여 ABTS radical(ABTS⁺·)을 만들고, ABTS radical은 732 nm에서 흡광도 값이 0.7 \pm 0.02가 되도록 PBS(phosphate buffer saline, pH 7.4)로 희석하여 사용하였다. 희석된 ABTS 용액 300 μ L와 농도별로 희석된 시료 100 μ L를 섞고 1분 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 ABTS 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC₅₀ 값으로 나타내었다.

통계처리

분석결과는 통계프로그램인 SAS(Statistical Analysis System software, ver. 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하였고, 분산분석(ANOVA)을 실시하여 통계적 유의성은 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

결과 및 고찰

청국장의 발효기간별 *trans*-resveratrol의 함량 변화

각 품종별 원료 콩과 청국장의 발효기간에 따른 *trans*-resveratrol의 함량 변화를 분석한 결과는 Table 1과 같다. 원료 콩과 발효기간을 달리한 청국장에서 생성된 *trans*-resveratrol 함량은 모두 늘찬, 대원, 태광의 순으로 높았으며, 원료 콩보다는 발효되었을 때 대체로 발효기간이 길어질수록 그 함량이 높게 나타났다. 특히 48시간 발효 후에는 3품종의 콩에서 늘찬, 대원 및 태광의 순으로 각각 50.06 \pm 0.82, 39.04 \pm 0.49, 34.00 \pm 0.54 μ g/g으로 원료 콩의 함량에 비하여 4배 이상 증가하였다. 이러한 결과는 원료 콩이 청국장으로 발효되면서 미생물이나 생물학적 또는 화학적, 환경적 변화 등으로 인하여 *trans*-resveratrol이 합성되는 것으로 생각되었다. 이는 Wang 등(29)이 땅콩보다는 9일

Table 1. *trans*-Resveratrol contents on different fermentation periods in each soybean varieties

Soybean varieties	<i>trans</i> -Resveratrol (μ g/g dry weight)				
	Raw	0 hr	12 hr	24 hr	48 hr
Daewon	9.42 \pm 0.31 ^{Eb}	14.70 \pm 0.21 ^{Ca}	13.49 \pm 0.39 ^{Db}	22.08 \pm 0.58 ^{Bb}	39.04 \pm 0.49 ^{Ab}
Nulchan	11.86 \pm 0.48 ^{Da}	15.26 \pm 0.55 ^{Ca}	16.16 \pm 0.66 ^{Ca}	24.77 \pm 0.77 ^{Ba}	50.06 \pm 0.82 ^{Aa}
Taekwang	7.88 \pm 0.17 ^{Ec}	10.41 \pm 0.27 ^{Cb}	9.23 \pm 0.35 ^{Dc}	16.16 \pm 0.22 ^{Bc}	34.00 \pm 0.54 ^{Ac}

All values are mean \pm SD (n=3).

Means with different superscripts within the same column (a-c) and row (A-E) are significantly different (P<0.001).

동안 발아시킨 땅콩나물에서 *trans-resveratrol* 함량이 높았으며 함량의 차이는 12.0~47.1 µg/g으로 각 품종에 따라 차이가 많았다고 보고한 것과 비교하면 생물학적 또는 화학적, 환경적 변화 등의 측면에서 보면 유사한 결과라고 할 수 있겠다.

한편 품종별 발효기간에 따른 *trans-resveratrol* 함량에서도 큰 차이를 나타내었다. 이것은 Ahn(30)의 포도 품종에 따른 발효 중 *trans-resveratrol* 함량의 차이가 있다는 보고와 Lee 등(11)의 3품종의 땅콩에서 *trans-resveratrol* 함량이 2.3~4.5 µg/g으로 비교적 큰 차이를 나타내었다는 보고에서도 품종 간의 차이를 인정한 것과 유사한 결과이었다. 이는 품종별 유전적 특성과 재배환경 등에 의하여 식물이 받는 스트레스의 차이에 의하여 결정되는 것으로 생각되었다.

Stachyose 및 raffinose의 함량 변화

비소화성 올리고당인 stachyose와 raffinose는 장내 유익균인 비피도박테리아에 의해 선택적으로 이용되어진다. 또한 장내 비피도박테리아의 성장을 촉진함으로써 부패균에 의한 대사산물 생성을 억제하고 배변활동의 증가를 유도하며, 혈장 내 총 지방, 콜레스테롤 및 중성지방 함량을 감소시켜 만성적 성인병의 유발을 억제하는 건강 기능적 특성을 나타낸다(31).

각 품종별 콩과 발효기간에 따른 청국장 stachyose와 raffinose의 함량 변화는 Table 2에 나타내었다. 품종별로 원료 콩과 증자 직후 콩에서의 stachyose 함량은 각각 10.84±0.42~13.05±0.13과 11.37±0.03~12.05±0.52 mg/g이었으나, 발효 12시간 후에는 0.16±0.01~0.33±0.02 mg/g으로 급격히 감소하여 원료 콩에 비하여 97% 이상이 줄어들었으며 발효 24시간 후부터는 전혀 검출되지 않았다. 이러한 경향은 원료 콩에 존재하는 stachyose(gal-gal-glc-fru)가 발효 중 미생물이 분비하는 α-galactosidase에 의하여 1분자의 galactose가 이탈되므로 발효가 진행될수록 stachyose는 점차 줄어들고, 발효 24시간 이후에는 완전히 분해되어 없어지게 되는 것으로 생각된다.

한편 raffinose의 함량은 원료 콩에서 2.66±0.09~3.54±0.05 mg/g으로 가장 낮았고, 증자 직후부터 발효 24시간 후에는 10.61±0.16~12.66±0.17 mg/g으로 약 3~4배가량 증가하였으나 48시간에서는 오히려 8.28±0.17~11.83±0.44 mg/g으로 감소하는 경향을 보였다.

이와 같이 발효 24시간까지 raffinose의 함량이 증가하는 것은 stachyose가 분해되어 raffinose(gal-glc-fru)로 되어 증가하는 것이며, 발효가 더욱 진행되어 48시간 이후에는 raffinose도 미생물이 분비하는 α-galactosidase에 의하여 1분자의 galactose가 이탈되므로 그 함량이 줄어들게 되는 것으로 생각되었다.

Choi 등(32)은 *Bacillus subtilis* DC-2 균을 이용하여 제조한 청국장의 발효 중 유리당 함량의 변화를 측정된 결과 sucrose, stachyose, fructose, glucose는 발효초기에 급격히 감소하였고 raffinose는 72시간까지 함량 변화가 적다고 보고하였으며, Son 등(33)의 연구에서 보고한 *Bacillus* sp. CS-17로 제조한 청국장의 발효 중 유리당 함량은 stachyose, sucrose와 glucose가 모두 발효초기에 급격히 소비되었고, raffinose는 발효 24시간에 함량이 급격히 증가한 후 48시간부터 점차 감소한다고 보고하여 본 실험 결과와 유사하였다.

주요 지표물질의 항산화효과

본 연구에서의 주요 지표물질인 *trans-resveratrol*, *cis-resveratrol*, stachyose 및 raffinose와 항산화제인 BHA, α-tocopherol의 비교 실험한 결과는 Table 3에 나타내었다. DPPH free radical 소거활성에서 *trans-* 및 *cis-resveratrol*은 RC₅₀ 값이 각각 8.46±0.05 µg/mL, 7.69±0.33 µg/mL로 나타났다. 또한 *trans-* 및 *cis-resveratrol*의 ABTS cation radical 소거활성은 RC₅₀ 값이 각각 5.02±0.0, 5.41±0.05 µg/mL로 나타났으며, FRAP assay에서 RC₅₀ 값이 각각 4.71±0.36, 5.18±0.56 µg/mL의 환원력을 나타내었다. 이는 BHA와 α-tocopherol의 항산화활성과 비교할 수 있을 정도로 높게 나타난 것이다.

이와 같은 경향은 *trans-resveratrol*의 항산화활성이

Table 2. Stachyose and raffinose contents on different fermentation periods in each soybean varieties

Oligosaccharides	Contents (mg/g)					P	
	Raw	0 hr	12 hr	24 hr	48 hr		
Stachyose	Daewon	13.05±0.13 ^{Aa}	11.37±0.03 ^B	0.33±0.02 ^{Ca}	ND ^D	ND ^D	***
	Nulchan	10.84±0.42 ^{Bb}	11.57±0.03 ^A	0.16±0.01 ^{Cb}	ND ^C	ND ^C	***
	Taekwang	11.26±0.63 ^{Bb}	12.05±0.52 ^A	0.28±0.04 ^{Ca}	ND ^C	ND ^C	***
	P	***	NS	***	NS	NS	
Raffinose	Daewon	2.66±0.09 ^{Eb}	4.54±0.13 ^{Da}	9.48±0.11 ^{Ca}	12.66±0.17 ^A	11.83±0.44 ^{Ba}	***
	Nulchan	3.54±0.05 ^{Da}	2.70±0.04 ^{Eb}	6.69±0.08 ^{Cb}	10.61±0.16 ^A	8.28±0.17 ^{Bb}	***
	Taekwang	3.46±0.61 ^{Ca}	4.93±0.58 ^{Ba}	11.25±2.15 ^{Aa}	11.68±2.23 ^A	7.08±0.09 ^{Bc}	***
	P	*	***	**	NS	***	

All values are mean±SD (n=3).

Means with different superscripts within the same column (a-c) and row (A-E) are significantly different. ND means not detected. NS means no significant. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Table 3. Antioxidant effect of target materials by DPPH, ABTS, and FRAP assays

Materials		RC ₅₀ values (µg/mL)		
		DPPH	ABTS	FRAP
Polyphenolics	<i>trans</i> -Resveratrol	8.46±0.05 ^b	5.02±0.0 ^d	4.71±0.36 ^b
	<i>cis</i> -Resveratrol	7.69±0.33 ^c	5.41±0.05 ^c	5.18±0.56 ^a
Oligosaccharides	Stachyose	— ^e	— ^e	— ^c
	Raffinose	— ^e	— ^e	— ^c
	BHA	6.72±0.09 ^d	8.10±0.26 ^a	NT
	α-Tocopherol	9.22±0.23 ^a	7.71±0.07 ^b	NT
	<i>P</i>	***	***	***

All values are mean±SD (n=3).

Means with different superscripts within the same column (a-e) are significantly different.

— means no effect. NT means did not test. ****P*<0.001.

DPPH, ABTS와 FRAP assay 등에서 RC₅₀ 값이 4.71±0.36~8.46±0.05 µg/mL인 것을 미루어 볼 때, 발효기간에 따라 유의적으로 증가한 *trans*-resveratrol의 영향이 일부 있었을 것으로 생각되었다.

Choi 등(34)은 품종별 오디 추출물의 *trans*-resveratrol 함량이 높을수록 항산화효과가 높다고 하였으며, Lee 등(35)의 연구에서는 오디 씨로부터 분리된 *trans*-resveratrol이 L-ascorbic acid에 비해 낮은 항산화활성을 나타내었지만, α-tocopherol에 비해 높은 항산화활성을 나타내었다고 하였다. 이러한 결과 청국장의 발효 과정 중 미생물에 의해 *trans*-resveratrol이 합성되어 증가할수록 DPPH, ABTS, FRAP의 항산화효과도 증가한다고 생각된다. 한편 비소화성 올리고당인 stachyose 및 raffinose는 항산화효과와는 관련이 전혀 없었다.

FRAP assay에 의한 항산화효과

FRAP assay는 낮은 pH에서 환원제에 의해 ferric tripyridyltriazine(Fe³⁺-TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine(Fe²⁺-TPTZ)으로 환원되는 원리를 이용한 것

으로, 대부분의 항산화제가 환원력을 가지고 있다는 점을 착안하여 고안된 방법이다(27). Table 4는 각 품종별 원료 콩과 발효기간에 따른 청국장의 methanol 추출물에 대한 환원력을 측정한 결과이다. 증자 직후 환원력(RC₅₀ values)은 0.41±0.40~0.28±0.28 mg/mL로서 원료 콩에서 환원력인 0.23±0.22~0.29±0.29 mg/mL보다 오히려 낮게 나타났다. 그러나 발효기간이 길어짐에 따라 12, 24 및 48시간에서의 환원력은 각각 0.20±0.20~0.26±0.25, 0.18±0.18~0.22±0.22 및 0.18±0.18~0.16±0.16 mg/mL로 약간 증가하는 경향을 보였다. 이러한 발효 과정 중의 항산화력의 증가는 여러 가지의 요인이 복합적으로 작용하였겠지만 본 연구에서의 지표물질인 *trans*-reaveratrol의 증가와도 관련이 있을 것으로 예상되었다.

DPPH assay에 의한 항산화효과

DPPH 라디칼 소거 활성법은 항산화 활성 물질이 DPPH의 라디칼을 소거시켜 탈색되는 점을 이용하여 항산화 활성을 쉽게 측정하는 방법이다. 전자공여 작용은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 지방질 산화를 억제시키는 척도로 사용되

Table 4. Antioxidant activities of *Cheonggukjang* on different fermentation periods and soybean varieties

Antioxidant assays	Soybean varieties	RC ₅₀ values (mg/mL)					<i>P</i>
		Raw	0 hr	12 hr	24 hr	48 hr	
FRAP	Daewon	0.23±0.01 ^{Bb}	0.28±0.01 ^{Ac}	0.20±0.00 ^{Cc}	0.19±0.01 ^{CDb}	0.17±0.01 ^D	***
	Nulchan	0.25±0.01 ^{Bb}	0.41±0.02 ^{Aa}	0.26±0.01 ^{Ba}	0.22±0.00 ^{Ca}	0.18±0.02 ^D	***
	Taekwang	0.29±0.03 ^{Ba}	0.37±0.01 ^{Ab}	0.23±0.00 ^{Cb}	0.18±0.01 ^{Db}	0.16±0.00 ^E	***
	<i>P</i>	**	***	***	**	NS	
DPPH	Daewon	0.68±0.02 ^{Bb}	0.72±0.00 ^A	0.62±0.01 ^{Cb}	0.60±0.01 ^{Db}	0.57±0.01 ^E	***
	Nulchan	0.70±0.01 ^{Bab}	0.74±0.03 ^A	0.64±0.01 ^{Cb}	0.61±0.02 ^{CDb}	0.59±0.01 ^D	***
	Taekwang	0.72±0.01 ^{Bab}	0.77±0.01 ^A	0.68±0.01 ^{Ca}	0.63±0.01 ^{Da}	0.59±0.01 ^E	***
	<i>P</i>	*	NS	***	**	NS	
ABTS	Daewon	0.64±0.00 ^B	0.71±0.02 ^{Aa}	0.56±0.01 ^C	0.45±0.01 ^{Dd}	0.41±0.01 ^{Ea}	***
	Nulchan	0.60±0.01 ^A	0.57±0.00 ^{Ab}	0.60±0.06 ^A	0.38±0.01 ^{Bc}	0.34±0.01 ^{Bc}	***
	Taekwang	0.68±0.05 ^A	0.59±0.04 ^{Bb}	0.63±0.01 ^{AB}	0.55±0.01 ^{Ca}	0.37±0.02 ^{Db}	***
	<i>P</i>	NS	***	NS	***	**	

All values are mean±SD (n=3).

Means with different superscripts within the same column (a-c) and row (A-E) are significantly different.

NS means no significant. ***P*<0.01, ****P*<0.001.

고 있을 뿐만 아니라 인체 내에서 노화억제 및 항산화효과와 관련된 중요한 생리기능을 나타내는 지표이다(36). 각 품종별 원료콩과 발효기간에 따른 청국장 methanol 추출물에 대한 DPPH free 라디칼 소거활성을 측정된 결과이다. DPPH 활성도 FRAP 활성과 마찬가지로 증자 직후의 활성(RC₅₀ values)은 0.77±0.01~0.72±0.00 mg/mL로서 원료콩의 활성인 0.68±0.02~0.72±0.01 mg/mL에 비하여 약간 낮게 나타내었다.

그러나 발효기간이 길어짐에 따라 12, 24 및 48시간에서 각각 0.62±0.01~0.68±0.01, 0.60±0.01~0.63±0.01 및 0.57±0.01~0.59±0.01 mg/mL로서 약간 활성이 증가하는 경향을 보였다. Kwak 등(37)은 청국장이 삶은 콩에 비하여 월등하게 항산화능이 증가한 것은 발효과정에서 생성된 폴리페놀 함량의 증가와 더불어 isoflavone 함량이 3.4배 증가하고 aglycone isoflavone 및 malonylglycoside isoflavone이 증가하였기 때문일 것이라고 보고하였다. Joo와 Park(9)은 백태와 태광콩의 에탄올 추출물과 이것으로 제조한 청국장의 에탄올 추출물을 비교한 결과 청국장 에탄올 추출물이 500 ppm에서 원료 콩에 비해 백태는 1.5배, 태광은 1.9배 높은 활성을 나타내었고, 1,000 ppm에서는 원료 콩에 비해 백태는 1.4배, 태광은 1.2배 높은 활성을 나타내었다고 보고하였다. 따라서 청국장 발효 과정 중에 saponins, trypsin inhibitor, phytic acid, 식이섬유, isoflavone, 비타민과 phenolic acid 등의 함량이 증가함으로 인하여 대두 발효 식품이 비발효 식품에 비하여 항산화활성이 높은 것이라고 생각된다.

청국장의 발효기간별 ABTS assay에 의한 항산화효과

ABTS와 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS 라디칼(ABTS⁺·)은 시료에 함유된 항산화성 물질의 항산화력에 의해 전자를 받아 무색의 물질로 환원시키며, 소수성과 친수성 시료 모두에 적용 가능하다(28). 각 품종별 원료콩과 발효기간에 따른 청국장의 methanol 추출물에 대한 ABTS cation radical 소거활성을 측정된 결과를 보면, 대원콩은 RC₅₀ value가 증자 직후에 0.71±0.02 mg/mL이었으나 발효가 진행될수록 활성이 증가하여 48시간에서는 0.41±0.01 mg/mL의 RC₅₀ value를 나타내었다. 늘찬콩과 태광콩은 증자 직후부터 발효 12시간까지는 RC₅₀ value가 0.63±0.01~0.60±0.06 mg/mL로 활성이 약간 감소하였으나, 발효 24시간이 경과하면서 활성이 증가하기 시작하여 발효 48시간에서는 0.34±0.01~0.37±0.02 mg/mL의 RC₅₀으로 활성이 증가하였다. 청국장의 발효 과정 중 daidzein 및 genistein의 함량이 증가한다고 알려져 있는데(38) 청국장 발효가 진행되면서 이러한 aglycon isoflavone류의 화합물들을 비롯한 미생물에 의해 분해되어 생성된 다양한 성분으로 인하여 항산화효과가 증가한다고 생각되었다.

요 약

몇 가지 식물에서 발견되는 항독성 물질(phytoalexin)인 *trans-resveratrol*(3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene)은 항암, 항산화효과 및 심혈관질환 등에 효과가 큰 물질로 알려져 있으며, 포도, 땅콩 및 오디 등의 발효 시에 증가되어 그 효과가 커지는 것으로 알려져 있다. 한편 stachyose 및 raffinose 등의 기능성 올리고당은 장내 미생물의 생육도와 저장작용을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 3품종의 대두를 이용하여 제조한 청국장의 발효 중 *trans-resveratrol*과 기능성 올리고당의 함량 변화를 조사하였으며, 이에 따른 항산화효과를 알아보려고 하였다. *trans-Resveratrol* 함량은 원료 콩보다는 발효되었을 때 대체로 발효기간이 길어질수록 그 함량이 높게 나타났다. 특히 48시간 발효 후에는 3품종의 콩에서 늘찬, 대원 및 태광의 순으로 각각 50.06±0.82, 39.04±0.49, 34.00±0.54 µg/g이었으며, 원료 콩에 비하여 4배 이상 증가하였다. Stachyose 함량은 원료 콩에서 10.84±0.42~13.05±0.13 mg/g, 증자 직후에는 11.37±0.03~12.05±0.52 mg/g이었으나, 발효 12시간 후에는 0.16±0.01~0.33±0.02 mg/g으로 원료 콩에 비하여 97% 이상이 줄어들었으며 발효 24시간 후부터는 전혀 검출되지 않았다. 한편 raffinose의 함량은 원료 콩에서 2.66±0.09~3.54±0.05 mg/g으로 가장 낮았고, 증자 직후부터 발효 24시간 후에는 10.61±0.16~12.66±0.17 mg/g으로 약 3~4배가량 증가하였으나 48시간에서는 오히려 8.28±0.17~11.83±0.44 mg/g으로 감소하는 경향을 보였다. 청국장의 발효기간에 따른 항산화효과는 FRAP, DPPH, ABTS assay 모두에서 증자 직후에는 원료 콩에서보다 다소 낮게 나타났으나 대체로 발효기간이 길어짐에 따라 활성이 높아지는 경향이였다. 이와 같은 경향은 *trans-resveratrol*의 항산화활성이 DPPH, ABTS와 FRAP assay 등에서 RC₅₀ 값이 4.71±0.36~8.46±0.05 µg/mL인 것을 미루어 볼 때, 발효기간에 따라 유의적으로 증가한 *trans-resveratrol*의 영향이 일부 있었을 것으로 생각되었다. 그러나 발효 중 기능성 올리고당(stachyose 및 raffinose)의 변화는 청국장의 항산화효과와는 관련이 없는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 경남과학기술대학교 기성회 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

1. Kim YH. 2006. Market trends of soy based products - Soy based beverages in the market of USA and Europe-. *Korean J Food Sci Technol* 39: 11-16.
2. Choi SH, Ji YA. 1989. Changes in flavor of *chungkookjang*

- during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 21: 229-234.
3. Lee YL, Kim SH, Choung NH, Yim MH. 1992. A study on the production of viscous substance during the *chungkookjang* fermentation. *J Korean Agric Chem Soc* 35: 202-209.
 4. Ryu SH. 2002. Studies on antioxidative effects and antioxidative components of soybean and *cheonggukjang*. *PhD Dissertation*. Inje University, Gimhae, Korea. p 23-122.
 5. Lee JJ, Kim AR, Lee H, Kim CH, Chang HC, Lee MY. 2011. Effects of soybean, *cheonggukjang* and *doenjang* on serum cholesterol level and weight reduction in rats fed a high-fat/high-cholesterol diet. *Korean J Food Preserv* 18: 226-235.
 6. Toshiro M, Yoo HJ, Hwang JS, Lee DS, Kim HB. 2004. Isolation of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *chungkookjang*. *Korean J Microbiol* 40: 355-358.
 7. Min HK, Kim HJ, Chang HC. 2008. Growth-inhibitory effect of the extract of porphyran-*chungkookjang* on cancer cell. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 826-833.
 8. Lee EH, Chyun JH. 2009. Effects of *chongkukjang* intake on lipid metabolism and liver function in alcoholic fatty liver rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1506-1515.
 9. Joo EY, Park CS. 2011. Antioxidant and fibrinolytic activities of extracts from soybean and *chungkukjang*. *Korean J Food Preserv* 18: 930-937.
 10. Kim JS, Yoo SM, Choe JS, Park HJ, Hong SP, Chang CM. 1998. Physicochemical properties of traditional *chonggugjang* produced in different regions. *Agric Chem Biotechnol* 41: 377-383.
 11. Lee MJ, Cheong YK, Kim HS, Park KH, Doo HS, Suh DY. 2003. *trans*-Resveratrol content of varieties and growth period in peanut. *Korean J Crop Sci* 48: 429-433.
 12. Dourtoglou VG, Makris DP, Bois-Dounas F, Zonas C. 1999. *trans*-Resveratrol concentration in wines produced in Greece. *J Food Comp and Anal* 12: 227-233.
 13. Paul B, Chereyathmanjiyl A, Masih I, Chapuis L, Benoit A. 1998. Biological control of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grapevine and elicitation of stilbene phytoalexin (resveratrol) by a soil bacterium. *FEMS Microbiology Letters* 165: 65-70.
 14. Roggero JP. 2000. Study of the ultraviolet irradiation of resveratrol and wine. *J Food Comp Anal* 13: 93-97.
 15. Lee NR, Choi SJ. 2009. Contents of resveratrol in different parts of various grape cultivars. *Korean J Food Preserv* 16: 959-964.
 16. Kim HB, Kim JB, Kim SL. 2005. Varietal analysis and quantification of resveratrol in mulberry fruits. *Korean J Seric Sci* 47: 51-55.
 17. Fremont L, Belguendouz L, Delpal S. 1999. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sci* 64: 2511-2521.
 18. Maccarrone M, Lorenzon T, Guerrieri P, Agro AF. 1999. Resveratrol prevents apoptosis in K562 cells by inhibiting lipoxygenase and cyclooxygenase activity. *Eur J Biochem* 265: 27-34.
 19. Pendurthi UR, Todd Williams J, Mohan Rao LV. 1999. Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells: A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 419-426.
 20. Lee HS, Sur EY, Kim WK. 2004. Resveratrol induces apoptosis in SW480 human colon cancer cell lines. *Food Sci Biotechnol* 13: 80-84.
 21. Rural Development Administration. 2013. [http://lib.rda.go.kr/newlib/dictN/dictSearch.asp? key word=soy oligosaccharide](http://lib.rda.go.kr/newlib/dictN/dictSearch.asp?key%20word=soy%20oligosaccharide).
 22. IM SD. 1995. The relationship of bifidobacteria and oligosaccharides. *New Food Industry* 37: 23-32.
 23. Choung MG, Lee JC. 2003. Functional characteristics of soybean oligosaccharide. *Korean J Crop Sci* 48: 58-64.
 24. Lee JJ, Cho CH, Kim JY, Kee DS, Kim HB. 2001. Antioxidant activity of substances extracted by alcohol from *chungkookjang* powder. *Korean J Microbiology* 37: 177-181.
 25. Joo EY, Park CS. 2010. Antioxidative and fibrinolytic activity of extracts from soybean and *chungkukjang* (fermented soybeans) prepared from a black soybean cultivar. *Korean J Food Preserv* 17: 874-880.
 26. Lee JH, Nam SH, Seo WT, Yun HD, Hong SY, Kim MK, Cho KM. 2012. The production of surfactin during the fermentation of *cheonggukjang* by potential probiotic *Bacillus subtilis* CSY191 and the resultant growth suppression of MCF-7 human breast cancer cells. *Food Chem* 131: 1347-1354.
 27. Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70-76.
 28. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
 29. Wang KH, Lai YH, Chang JC, Ko TF, Shyu SL, Chiou RY. 2005. Germination of peanut kernels to enhance resveratrol biosynthesis and prepare sprouts as a functional vegetable. *J Agric Food Chem* 53: 242-246.
 30. Ahn JB. 2006. Development of red wine containing high level of *trans*-resveratrol with domestic grape. *Food Eng Prog* 10: 226-232.
 31. Choung MG, Lee JC. 2003. Functional characteristics of soybean oligosaccharide. *J Crop Sci* 48: 58-64.
 32. Choi UK, Son DH, Ji WD, Im MH, Choi JD, Chung YG. 1998. Changes of taste components and palatability during *chunggugjang* fermentation by *Bacillus subtilis* DC-2. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 840-845.
 33. Son DH, Kwon OJ, Ji WD, Choi UK, Kwon OJ, Lee EJ, Cho YJ, Cha WS, Chung YG. 2000. The quality changes of *chunggugjang* prepared by *Bacillus* sp. CS-17 during fermentation time. *J Korean Soc Agric Chem* 43: 1-6.
 34. Choi IS, Moon YS, Kwak EJ. 2012. Composition of resveratrol and other bioactive compounds, and antioxidant activities in different mulberry cultivars. *Kor J Hort Sci Technol* 30: 301-307.
 35. Lee YJ, Kim EO, Choi SW. 2011. Isolation and identification of antioxidant polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) seeds. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 517-524.
 36. Lee JJ, Kim AR, Chang HC, Lee MY. 2009. Antioxidative effects of *chungkukjang* preparation by adding solar salt. *Korean J Food Preserv* 16: 238-245.
 37. Kwak CS, Lee MS, Park SC. 2007. Higher antioxidant properties of *chungkookjang* a fermented soybean paste, may be due to increased aglycone and malonylglycoside iso-flavone during fermentation. *Nutr Res* 27: 719-727.
 38. Shon MY, Seo KI, Lee SW, Choi SH, Sung NJ. 2000. Biological activities of *chungkugjang* prepared with black bean and changes in phytoestrogen content during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 32: 936-941.