

양어용 사료첨가제로서 감귤발효액 (EM-Fermented Orange)의 항산화특성

문 상 옥* · 이 영 돈* · 이 준 백 · 고 유 봉
*제주대학교 해양연구소, 제주대학교 해양학과

Antioxidant Characteristics of EM-Fermented Orange as an Additive in Fish Feed

Sang-Wook Moon*, Young-Don Lee*, Joon-Baek Lee and You-Bong Go

*Marine Research Institute of Cheju National University, Jeju-Do, 695-810, Korea

Department of Oceanography, Cheju National University, Jeju-Do, 690-756, Korea

Mandarine orange (*Citrus unshiu* Marc.) only added with sugar was fermented by effective microorganisms (EM), called "EM-fermented orange". EM was mainly composed of lactic acid bacteria, phototrophic bacteria and yeast. As pH of EM-fermented orange reached 3.5 to 4.0 in the course of fermentation, the incubation was stopped, and then, EM-fermented orange was preservable at room temperature for about 6 months. Composition and concentration of free amino acids in EM-fermented orange were analyzed. Concentration of total amino acids was 167 mg/l, and the relative content of carnosine (β -alanyl-L-histidine) which was well known as a kind of antioxidant materials was very high, 41%. In addition, crude extract showing antioxidant activity could be obtained from EM-fermented orange using some organic solvents. The antioxidant activity of the crude extract was equivalent to about 9% of that of vitamin E by the use of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method. It was suggested that EM-fermented orange having antioxidant characteristics could promote the health of fish.

Key words : EM-fermented orange, carnosine, antioxidant activity, crude extract, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

서 론

감귤 (*Citrus unshiu* Marc.)은 맛이 좋을 뿐만 아니라 구연산, 플라보노이드, 카로티노이드, 비타민 C 등의 기능성 물질을 함유하고 있어 영양적인 측면에서도 가치가 높은 겨울철 과일이다 (조, 1999). 제주에서의 감귤생산량은 약 50만톤/년 내외로서, 감귤농업은 경제적 측면에서 제주농업의 토대를 이루고 있다.

감귤을 유용미생물 (EM Microorganisms)에 의해 일정 조건에서 발효시킨 것을 감귤발효액 (EM-

Fermented Orange)이라고 한다 (이·문, 2000; 송, 2000). 이 감귤발효액을 넙치에 일정기간 사료와 함께 경구투여하였을 때, 넙치의 간과 장의 기능이 향상되고, 성장이 촉진되었다 (송, 2000).

감귤발효액은 감귤이 함유하고 있는 기능성 영양물질 등과 발효미생물이 생산하는 생리활성물질 등이 함유되어 있으며, 발효미생물이 대사과정중에 생산하는 젖산, 초산 등에 의하여 산도가 높은 조건 (pH 3.5~4.0)에서 6개월 이상 상온에서 보존가능하게 된다.

산소호흡에 의해 에너지를 획득하는 생물은 여러 가

지 요인에 의해 독성을 갖는 산소화합물 (O_2^- , $HO \cdot$, H_2O_2 , 1O_2 등)이 생체내에서 생성되어지나, 이들 물질에 대한 방어기구로서 superoxide dismutase (SOD), catalase, peroxidase 등의 항산화효소와 함께 vitamin E, vitamin C, glutathion, ubiquinone, uric acid 등과 같은 항산화물질이 존재하여 스스로를 보호하고 있다 (김·유, 1996). 그러나, 이와 같은 생체방어기구에 이상이 초래되거나 과도한 스트레스 또는 각종 물리적, 화학적 요인들에 의하여 상기의 산소화합물의 생성이 생체방어계의 용량을 초과하게 될 경우 산소독성에 의한 세포파괴가 유발되어 암, 뇌질환, 심장질환, 동맥경화, 소화기질환, 류마티스, 자기면역질환 등의 질병발생 및 노화촉진 등이 야기된다 (김·유, 1996). 따라서, 이와 같은 산소독성을 제거 또는 완화시켜주는 항산화물질의 이용은 매우 중요하다고 할 수 있다.

이 연구는 감귤발효액의 여러 성분들중에서 항산화활성 물질을 탐색하고, 그 기초적인 특성을 파악하는 것을 목적으로 하였다.

재료 및 방법

감귤발효액 (EM-Fermented Orange)의 제조

세척된 감귤을 잘게 분쇄하고, 이 분쇄액에 당 (3%, w/v)을 첨가하며, 1.0 M의 NaOH용액을 이용하여 pH를 6.0 내지 7.0으로 조절한 후, 광합성세균, 유산균, 효모가 중심이 되는 미생물 첨가 혼합물을 최종 발효액의 10% (v/v)가 되도록 접종하였다. 감귤발효에는 유산균, 광합성세균, 효모 등의 유용미생물군을 이용하였다. 발효는 SW-LCD 배양기 (Sangwoo scientific corp.)를 이용하여 38~40°C에서 7~8일간 수행되었다. 발효완료시의 pH는 3.5 내지 4.0이며, 발효가 완료된 분쇄액을 여과하고, 여과액을 감귤 발효액 (EM-Fermented Orange)이라 한다.

감귤발효액 (EM-Fermented Orange)의 유리아미노산 분석

아미노산 분석은 amino acid analyzer S433 (Sykam,

Germany)를 이용하여 ninhydrin법으로 수행되었다. 시료는 coarse filter paper로 1차 여과하고, 1차여과액을 0.2 μm filter로 2차여과한 후, 이 여과액을 5배 희석하여 아미노산 분석을 실시하였다.

감귤발효액 (EM-Fermented Orange)으로부터 항산화활성 물질의 추출

감귤발효액을 0.2 μm filter로 여과하여 고형물질과 액상으로 분리하여 항산화활성 물질의 탐색을 시도하였다. 이 실험에서는 항산화활성의 유무를 판별하는 방법으로 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성법을 이용하였으나, 감귤발효액에 함유되어 있는 유기산들 (감귤발효액 pH 3.5~4.0)에 의해 정확한 항산화활성 정도를 나타내기가 어려웠다. 따라서, 고형물질을 이용하여 항산화활성 물질의 추출을 시도하였으며, 개략적인 방법은 다음과 같다.

고형물질을 아세톤:메틸알콜:물 (7:2:1) 혼합액으로 추출하고, 감압농축하였다. 이 추출액에 에틸아세테이트 (1:3)를 첨가하여 잘 혼합한 후 에틸아세테이트층을 얻는다. 에틸아세테이트를 상온에서 건조시킨 후, 알콜에 녹여서 녹는 것만 원심분리 (10,000 rpm, 15 min)하여 분리한 주추출물을 항산화활성 측정에 이용하였다.

항산화도 측정

추출물의 항산화활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성으로 측정하였다 (Blois, 1958). DPPH는 그 자체가 매우 안정한 free radical로서 알콜 등의 유기용매에서 매우 안정하며, 여러 가지 항산화기작 중 proton-radical scavenger에 의해 탈색되기 때문에 흡광도를 이용하여 항산화활성을 쉽게 측정할 수 있는 장점이 있다.

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma) 약 24 mg을 에탄올 100 ml에 녹여 DPPH용액으로 제조하고, 이 용액 3 ml에 에탄올을 첨가하여 총 100 ml가 되게 하였다. 이 DPPH용액 희석액 3 ml에 추출물 시료 1.6 mg/ml 용액 0.1 ml를 첨가하여 충분히 혼합하고, 약 20분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도

Table 1. Free amino acids in EM-Fermented Orange

| Ingredients | Concentration (mg/l) | Relative content (%) |
|----------------------|----------------------|----------------------|
| Phosphoserine | 1.86 | 1.11 |
| L-aspartic acid | 7.83 | 4.68 |
| L-threonine | 4.50 | 2.69 |
| L-serine | 6.36 | 3.81 |
| L-glutamic acid | 17.31 | 10.36 |
| Glycine | 2.64 | 1.57 |
| L-alanine | 9.21 | 5.51 |
| L-valine | 3.00 | 1.80 |
| L-methionine | 3.39 | 2.03 |
| L-isoleucine | 6.63 | 3.97 |
| L-leucine | 11.34 | 6.78 |
| L-tyrosine | 4.86 | 2.91 |
| L-phenylalanine | 7.05 | 4.22 |
| NH ₃ | 3.06 | 1.83 |
| L-lysine | 6.78 | 0.04 |
| l-methyl-L-histidine | 2.49 | 0.02 |
| L-carnosine | 68.85 | 41.19 |
| Total | 167.16 | 100.00 |

를 측정하였다. 항산화활성의 대조구로서 vitamin E (1000 IU Vitamin E/g. Sigma)를 사용하였다.

결과 및 고찰

감귤발효액은 감귤을 유산균, 광합성세균, 효모 등의 미생물을 이용하여 발효시킨 천연물이다. 발효완료시의 pH는 3.5~4.0이며, 낮은 pH조건은 감귤발효액의 장기 보존성과 밀접한 관계가 있는 것으로 판단된다.

Table 1은 감귤발효액에 존재하는 유리아미노산의 종류와 농도를 나타내고 있다. 감귤발효액에 존재하는 유리아미노산의 총 농도는 약 167 mg/l이며, 전체 유리아미노산 중 디펩티드인 carnosine (β -alanyl-L-histidine)이 약 41%를 차지하였다 (Table 1). 이외에도 상대적인 함량이 4% 이상 차지하는 아미노산으로는 L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-alanine, L-leucine, L-phenylalanine 등이며, carnosine을 포함한 이들의 상대적인 함량은 전체 아미노산의 약 73%에 해당된다. 감귤 14품종의 과즙에 함유된 주요 아미노산은 arginine, asparagine, serine, glutamic acid,

proline, alanine 등의 6종류이며, 이들 아미노산은 전체 아미노산량의 85~94%를 차지한다 (원예연구소, 1996). 감귤발효액과 감귤과즙에서 나타나는 주요 아미노산 구성의 차이는 발효미생물의 성장활동에 주로 기인하는 것으로 판단되었다.

carnosine은 주로 척추동물의 골격근, 심근, 후각기관, 상피조직, 뇌, 눈 등에 다량으로 존재하는 수용성 물질이며 (Crush, 1970), 생체 내에서의 완충작용 (Harris et al., 1990), 항암 및 항노화작용을 수행하는 것으로 알려져 있다 (Hipkiss et al., 1998). 이외에도, 항산화 기작의 한 예로서, 미량금속-비타민 C 촉매의 deoxyribose 시스템에서 deoxyribose의 분해를 억제하여, 백내장이나 빈혈치료에도 유효한 것으로 나타나고 있다 (Lee et al., 1999).

디펩티드인 carnosine은 감귤발효액내의 타 아미노산에 비해 상대적으로 높은 농도로 존재한다 (Table 1). 감귤발효액의 발효과정 중에 유기산 등의 농도가 높아지면서 발효액의 pH가 급격히 낮아지게 되는데, 발효미생물의 성장에 대한 산성조건은 일종의 강한 스트레스로 작용할 가능성이 높으며, 성장 뿐만 아니라 생존에 영향을 끼치는 요인으로서 작용하게 된다 (Stanier et al., 1976). 낮은 pH에 대한 발효미생물의

완충기작의 유무는 상당히 중요하게 되며, 완충효과를 갖는 물질을 체내 및 체외에 축적하는 것도 산성 조건이라는 환경스트레스에 대한 방어기작이 될 수 있으나, 앞으로 구체적인 실험에 의해 명확히 밝혀져야 할 것으로 생각된다.

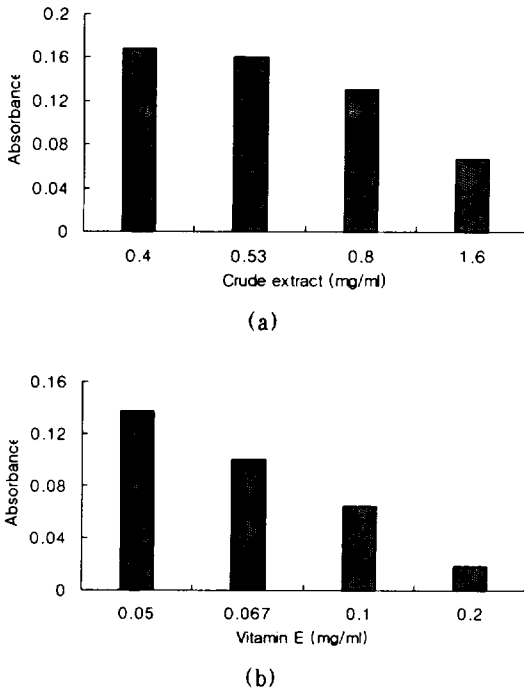


Fig. 1. Absorbance of DPPH solution added with diluted solutions of crude extract(a) and vitamin E(b), respectively.

Fig. 1a는 감귤발효액으로부터 추출한 지용성 물질의 항산화활성을 나타내고 있다. 이 추출물의 항산화 활성 정도를 vitamin E를 이용하여 비교하였다 (Fig. 1b). DPPH 용액 3 ml에 시료 (1.60, 0.80, 0.53, 0.40 mg/ml) 0.1 ml 씩 첨가한 후, DPPH 라디칼 소거활성을 측정하였으며 (1 cm, 517 nm), 각각의 흡광도는 0.067, 0.130, 0.160, 0.168 등으로 나타났다 (Fig. 1a). vitamin E (0.200, 0.100, 0.067, 0.050 mg/ml) 용액을 상기와 같은 방법을 이용하여 측정한 흡광도는 0.018, 0.064, 0.100, 0.137 등으로 나타났다 (Fig. 1b). 이들 흡광도를 이용하여 각각의 DPPH 라디칼 소거 활성식을 구하면 다음과 같다.

추출물의 DPPH 라디칼 소거

$$Y = -0.0340x + 0.2166 \quad (r=0.9)$$

Vitamin E의 DPPH 라디칼 소거

$$Y = -0.0473x + 0.2020 \quad (r=0.9)$$

여기서, y는 DPPH의 농도이며, x는 추출물 또는 vitamin E의 흡광도값이다.

이 식들로부터 감귤발효액 추출물의 항산화 활성도는 Vitamin E의 약 9% 수준에 상응되었다. Vitamin E와 비교할 때 낮은 항산화 활성도를 나타내고 있으나, 추출물로부터 더욱 정제하여 순수한 단일물질을 분리하게 되면, 그 항산화 활성도는 상당히 향상될 것으로 추정되었다.

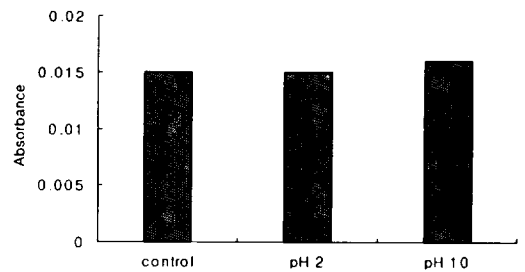


Fig. 2. Antioxidant activity (absorbance) of acid- and alkali-treated crude extract.

Fig. 2는 감귤발효액 추출물의 열 및 산, 알칼리에 대한 항산화 활성의 변화를 나타내고 있다. 일정량의 추출물을 물과 에탄올 혼합액 (1:1)에 녹인 것을 시료 (pH 7.25)로 하고, 0.1N HCl 및 NaOH 용액으로 시료의 pH를 각각 2, 10으로 조절하였다. 각각의 시료를 100 °C에서 15분간 열처리하여 실온으로 냉각한 후 pH를 중성부근 (pH 7.00~7.30)으로 조절하였다. 이들 시료의 DPPH 라디칼 소거활성을 분광광도계 (1 cm, 517 nm)를 이용하여 측정하였다. DPPH용액 희석액 3 ml에 상기의 시료 0.1 ml를 첨가하여 잘 혼합한 후 초기 흡광치와 15분 후의 흡광치를 측정하여 이들의 감소 정도를 항산화 활성도로 하였다. 추출물은 열 및 산, 알칼리의 처리 후에도 대조구와 비교할 때 동등한 항산화 활성도를 나타내었다 (Fig. 2). 이는 앞으로의 분리정제 및 이용성에 대해 용이하고 가치가 높다는 것을 나타내고 있다.

식품첨가물로서의 항산화제 개발을 위한 연구에서 최근 각종 질병 및 노화 등에 활성산소 및 과산화물이 직접적인 원인으로 작용한다는 사실이 밝혀지면서 항산화제 연구는 질병치료제로서의 항산화제를 찾는 연구로 전환되고 있는 실정이다 (김·유, 1996). 지금까지 개발되어 사용되고 있는 항산화제로는 tert-butylhydroxytoluene (BHT), tert-butylhydroxyanisol (BHA) 등과 같은 합성항산화제, vitamin E, carotenoid, flavonoid, 탄닌 등과 같은 일부 천연 항산화제 및 SOD와 같은 항산소성효소에 국한되어 있는 실정이며, 이들 항산화제는 독성, 낮은 활성 및 용도의 한계성 등의 여러 가지 문제로 인하여 사용에 제한을 받고 있다 (김·유, 1996). 따라서, 보다 안전하면서도 강한 항산화활성 물질을 천연물 또는 미생물로부터 탐색하는 연구가 현재 활발히 수행되고 있다 (김·유, 1996).

감귤발효액을 양식어에 일정기간 경구투여하였을 때, 양식어의 성장이 촉진되고, 혈액 중 GOT, GPT, Total cholesterol 등의 농도가 현저히 저하되었으며, 어류 장상피에 존재하는 배상세포 (Goblet cell)의 수가 현격히 증가되었다 (송, 2000). 감귤발효액에 함유되고 있는 여러 기능성 물질들이 단일적 또는 복합적으로 어류의 성장과 건강에 기여하였다고 추정되어지며, 이들 물질들 중에서 상기와 같은 항산화물질들은 소화관내에서의 산패억제 뿐만 아니라 세포 수준에서의 활성산소에 의한 산화적 파괴를 억제할 것으로 사료되었다.

감귤발효액 추출물로부터의 항산화물질의 분리·정제 및 구조 파악 등의 연구가 선행되어야 하며, 감귤발효액의 이용활용도를 높이는 중요한 요인들이 될 것이다.

사 사

이 연구는 2000년 제주대학교 발전기금 연구과제 (해양연구소)에 의해 수행되었다. 연구수행에 있어서 해양연구소의 실험기자재를 이용하였으며, 여러 가지로 협력하여 주신 해양연구소 직원 여러분께 깊은 감사사를 드립니다. 아미노산 분석 실험에 도움을 주신

부경대학교 사료영양학 연구실의 배승철 교수님과 항산화 활성 측정법 등 여러 가지로 많은 자문을 하여 주신 University of Southern California의 김종평 선생님께 심심한 감사를 드립니다.

요 약

당을 첨가한 감귤 (*Citrus unshiu* Marc.)을 유용미생물 (effective microorganisms (EM))에 의해 발효시켰으며, 이를 "EM감귤발효액 (EM-fermented orange)"이라 한다. EM미생물은 주로 유산균, 광합성세균, 효모 등으로 구성되어 있다. 발효과정 중에 EM감귤발효액의 pH가 3.5에서 4.0에 이르게 되면, 배양을 중지하였으며, EM감귤발효액은 실온에서 약 6개월간 보존가능하였다. EM감귤발효액에 함유된 유리아미노산의 조성 및 농도를 분석하였다. 전체 유리 아미노산의 농도는 167 mg/l였으며, 항산화 물질로 잘 알려져 있는 carnosine (β -alanyl-L-histidine)의 전체 아미노산에 대한 상대적 함량은 약 41%에 달하였다. 이외에도, 유기용매들을 이용하여 EM감귤발효액으로부터 항산화 활성을 나타내는 추출물을 획득하였다. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)의 이용에 의해, 이 추출물의 항산화 활성은 vitamin E의 약 9%에 상응하는 것으로 나타났다. 항산화 특성을 갖는 EM감귤발효액은 어류의 건강을 증진시킬 수 있는 것으로 사료되었다.

참고문헌

- 김종평·유익동, 1996. 항산화제 탐색. In 「신물질 탐색」, 김창진, 이형규, 김영호, 김시관, 서영배, 이현선, 윤봉식(편저), 자유아카데미, 서울, pp. 325-349.
- 송영보, 2000. EM-fermented orange가 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 성장에 미치는 영향. 제주대학교 석사 학위 논문.
- 원예연구소, 1996. 과실의 특성과 저장가공기술, pp. 136-138.

- 이영돈 · 문상옥. 2000. 양식용 사료첨가제로서의 감귤 발효액 및 그 제조방법. 대한민국 특허출원번호 제 10-2000-71748호.
- 조현준. 1998. 감귤함유기능성물질. 감귤연구소식. 2: 24-28.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 181: 1199-1200.
- Crush, K.G. 1970. Carnosine and related substances in animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 34: 3-30.
- Harris, R.C., Marlin, D.J., Dunnet, M., Snow, D.H. and E. Hultman. 1990. Muscle buffering capacity and dipeptide content in the thoroughbred horse, greyhound dog and man. *Comp. Biochem. Physiol.* 97A. pp. 249-251.
- Hipkiss, A.R., Preston, J.E., Himsworth, D.T., Worthington, V.C., Keown, M., Michaelis, J., Lawrence, J., Mateen, A., Allende, L., Eagle, P.A. and N.J. Abott. 1998. Pluripotent protective effects of carnosine, a naturally occurring dipeptides. *Ann. NY Acad. Sci.* 854: 37-53.
- Lee, B.J., Lee, Y.S., Kang, K.S., Cho, M.H. and D.G. Hendricks. 1999. Carnosine and related compounds protect against copper-induced damage of biomolecules. *J. Biochem. Mol. Biol.* 32: 350-357.
- Stanier, R.Y., Adelberg, E.A. and J.L. Ingraham. 1976. *The microbial world*, 4th ed., Prentice-Hall, New Jersey. pp. 35-42.