

포도씨 추출물이 코팅된 저장성이 높은 고부가가치 기능성 쌀의 개발

장재권 · 안장우 · 최연배 · 이상준

(청강문화산업대학 식품생명과학과)

Development of functional rice coated grape seed extract making high value

Jang, Jae-Kweon · Ahn, Jang-Woo · Choi, Yeon-Bae · Lee, Sang-Jun

Dept. of Food Biotechnology College of Chungkang Munhwa Industry, Icheon San 37, Korea

적 요

쌀을 고부가가치화 하기 위한 기반연구로서 포도가공시에 부산물로 생성되는 포도씨의 유용성분인 폴리페놀의 최적의 추출조건과 이 유용성분의 종합적인 천연항산화기능과 쌀과 쌀밥에 대한 저장성향상효과 및 쌀에 대한 최적의 코팅조건을 연구하였다. 포도씨를 용매를 달리하여 추출하고, 그 추출물들을 동결건조하여 건조수율과 총 페놀함량을 비교한 결과 70% 에탄올로 환류, 가열 추출한 조건이 각각 추출 전 중량 대비 4.3%와 51%로 최적이었으며 일반성분함량은 탄수화물이 29.6%로 가장 높게 함유되어 있었고 회분과 단백질 및 조지방이 3% 내외로 함유되어 있었다. 항산화기능은 총 4가지의 항목(산가, 과산화물가, TBARS, DPPH)에 대해 기존 항산화제인 BHT, 토코페롤, 비타민 C 등과 비교 조사한 결과 70% 에탄올 포도씨 추출물(GSE)이 대단히 뛰어난 항산화기능을 보였다. 기능적인 측면에서도 동맥경화의 원인인 산화된 human LDL(low density lipoprotein)의 형성에 대해 높은 억제 기능을 나타내었다. 또한 GSE는 쌀밥의 부패균인 고초균(*Bacillus subtilis*)에 대해서도 생육억제 효과를 보였다. GSE 현탁액으로 25~30°C의 코팅온도에서 코팅한 GSE 코팅쌀은 GSE 자체의 항산화력에서 기대된 것 처럼 쌀의 지방의 산패에 대해 높은 항산화력을 보였으며 햄쌀로서의 저장 안정성을 보였다. 이러한 결과들로부터 GSE 코팅쌀은 높은 천연 항산화력에 의해 쌀의 지방의 산패를 억제하고 쌀과 쌀밥의 부패균에 대한 억제효과를 지닌 햄쌀의 저장수명을 연장시키는 저장기능성과 산화된 LDL의 형성억제에 의해 동맥경화 예방효과가 기대되는 기능성효과를 지닌 기능성 코팅쌀이라고 할 수 있다.

I. 서론

쌀은 세계적으로 중요한 작물의 하나이며 한국인의 주식으로 식생활에 중요한 부분을 차지하고 있으며 높은 탄수화물 조성(현미: 단백질 7~8%, 수분 14% 내외, 탄수화물 76%, 지질 2~3%, 무기질은 K,

P가 대부분)을 가지고 있다. 그러나 쌀의 1인당 소비량은 1980년 이후 지속적인 감소 추세를 보이고 있으며, 1995년에는 104.3Kg으로 연평균 2.0%의 감소를 보이고 있다. 이는 기호 만족도가 국수나 빵에 비해 떨어지는 식문화의 변화로 인해 쌀의 주요 소비원인 쌀밥의 소비가 감소되는 것이 주된 원인이라고 할 수 있다. 국내 쌀 재배 면적과 생산량 동향을 살펴보

면 1988년 각각 1,260천 ha 및 6,054천 톤이었던 데 1996년 1,050천 ha 및 5,323천톤으로 매년 감소하는 추세이다. 쌀 농업은 농가소득 중에서 30.3%를 차지하고 있어 쌀에 대한 농민의 의존도는 매우 높은 편이다. 현재까지는 쌀의 국내 자급이 가능하나, 향후 외국산 쌀의 수입 증가와 1인당 쌀 소비량 감소추세, 수입쌀과의 가격 경쟁력 등을 고려하면 국내의 쌀 산업 전망은 그리 밝은 편이 아니라고 할 수 있다. 우리나라 식생활에서 쌀밥이 차지하는 비중은 거의 절대적이며 생존 그 자체임에도 불구하고 이에 대한 연구는 취반 기호 특성 및 쌀밥의 레토르트화 등 극히 일부에 한정되어 있으며, 최근에는 도시 직장인과 행락 객을 중심으로 도시락 문화가 크게 발달하고 있고, 하절기에 변질, 식중독 발생 등의 문제점이 발생하고 있어 이들의 저장성 향상에 관한 연구도 시급한 실정이다. 그럼에도 불구하고 이러한 쌀의 저장성을 향상시키고자 하는 연구는 극히 제한적으로 노등(1996)의 녹차의 물 추출물이 부패한 쌀밥에서 분리 동정한 *Bacillus subtilis* RHJ-1에 대해 항균활성을 갖는다는 보고가 있을 정도이다. 이러한 저장성을 높이기 위해서는 쌀의 햅쌀로서의 그 품질의 유지와 쌀의 지방의 산패 및 쌀밥부패균의 생육억제 등 부가가치를 높이는 방안이 필요하다고 할 수 있다. 또한 쌀의 부가가치를 보다 향상시키고자 기능성측면을 강화한 연구는 쌀에 버섯의 균사체를 배양하여 개발한 버섯쌀을 들 수 있으나 쌀밥에 대한 첨가물로서의 기능적인 측면이 강해 쌀의 본연의 형태를 유지하면서 기능적인 특성을 강화한 제품의 개발이 필요하다고 할 수 있다.

포도는 포도과육을 잘게 자른 포도다이스, 포도농축액 등을 제조하기 위한 1차 가공공정에서 반드시 포도의 씨가 제거되어야 하며 씨를 빼는 별도의 설비투자 기계를 사용해야 한다. 이러한 1차가공 원료인 포도농축액과 포도과육을 제과류, 음료 및 유업업계에서 제품원료로 사용하고자 하는 시도가 늘수록 부수적으로 포도씨가 많이 나올 수 밖에 없으며 현재 이 포도씨는 유효성분이 많음에도 불구하고 별도의 수지가 맞는 경우가 아닌 한 국내에서는 포도씨를 제거하는 포도 과육 가공업체에서 폐기되고 있는

실정이다. 포도씨로부터 압착공정에 의해 기름을 분리한 포도씨유는 현재 건강보조식품으로 인정되어 있으며 포도씨에는 polyhydroxy flavan-3-ol units의 oligomer와 polymer인 proanthocyanidin 이라고 하는 폴리페놀 화합물이 유용물질로서 함유되어 있다 (Jorge, 1991). 이러한 포도씨의 유용물질은 유리 래디컬 소거작용(Castillo, 2000), 동맥경화억제(有井雅幸, 1999, 有賀 敏明, 1999), 노인성치매, 당뇨, 대장암예방등(有井雅幸, 1999)에 관한 생체내의 효과에 대한 많은 연구가 행해지고 있다. 이러한 폴리페놀류의 기능에 대해서는 잘 알려진 녹차의 카테킨을 들 수 있다. 이 카테킨 성분은 콜레스테롤을 저하시키고, 고혈압이나 동맥경화를 억제하며, 과산화지질의 생성을 억제하여 노화를 예방하고 혈청중의 지질농도를 저하시키며, 중성지질의 생성을 억제하여 비만을 방지하고 모세혈관의 저항력을 증진시킨다고 알려져 있다. 그러나 녹차를 이용하려면 원료비가 상당히 고가일 수 밖에 없으며 기능적인 측면에서도 녹차의 폴리페놀과 비교할 때 포도씨의 폴리페놀류는 녹차의 카테킨이 중합된 구조인 중합체의 구조(Jorge, 1991)를 지니고 있어서 녹차보다 항산화력이 뛰어날 것으로 기대되고 있다. 포도씨의 유용성분인 폴리페놀성분의 최적의 추출조건에 대해서도 거의 보고되고 있지 않으며 지방질식품에 대한 항산화성에 대해서 제한된 연구(Gamez-Meza, 1999)만이 있어 기존의 항산화제와의 기능 비교 및 산가, 과산화물가, 수소공여능(DPPH(1,1-Diphenyl-2-picryl hydrazil))과 TBA(2-thiobarbituric acid)가의 4가지 관점에서 항산화성에 대한 보다 종합적인 평가 연구가 필요하다고 할 수 있다. 이러한 항산화력에 관한 연구들은 최근 인체의 DNA, RNA, 단백질, 지방질 등과 반응하여 각종 염증, 암, 생체의 노화등을 유발시키는 활성산소종(reactive oxygen species)라고 하는 superoxide anion radical($O_2 \cdot^-$), 과산화수소(H_2O_2), hydroxyl radical($HO \cdot$)의 생성억제(Halliwell, 1984)와도 관련이 되기 때문에 비중있는 연구분야라 할 수 있다. 이러한 기능성과 연관이 깊은 포도씨의 항산화력의 우수성을 밝히고 유용성분을 최적의 조건에서 추출하여 쌀에 적용하는 실험은 쌀의 저장성과 기능적인 측면

이 강조된 고부가가치 쌀의 제조가 가능하다고 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 쌀밥의 소비감소와 국내의 쌀 산업전망을 개선하기위해 쌀의 부가가치를 높이기 위한 연구의 일환으로 포도씨의 유용물질을 최적 조건에서 추출하여 종합적인 항산화력과 쌀밥의 부패균에 대한 항균력의 우수성에 대한 기반연구로부터 쌀에 대한 코팅조건을 연구함으로써 쌀의 저장성과 밥맛의 향상 및 항산화력으로 부터 콜레스테롤 성분인 LDL(low density lipoprotein)의 산화억제 및 예상되는 활성산소에 의한 질병예방에 대한 기능성 효과를 기대할 수 있는 기능성 코팅쌀을 개발하였기에 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

포도씨는 서울 후암시장에서 판매하는 적포도를 구입하여 과육으로부터 분리하여 수세 건조한 후 본 실험의 시료로 사용하였다. 시약은 human LDL, linoleic acid methylester, linoleic acid, 2-thiobarbituric acid(TBA), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), butylated hydroxytoluene(BHT), α -tocopherol은 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하여 사용하였으며 그의 시약은 특급이나 일급을 사용하였다.

2. 포도씨 추출물의 제조 및 총페놀함량 분석

포도씨의 유용물질인 폴리페놀이 가장 많이 추출될 수 있는 용매 추출조건을 선별하기 위하여 포도씨의 지방을 석유 에테르로 제거하고 건조한 후 건조한 포도씨 50 g에 용매를 300 mL를 넣어 6시간 동안 추출하여 냉각시킨 후 잔사를 다시 600 mL의 용매를 넣어 반복 3회 추출하였다. 용매추출조건은 용매로 물, 에탄올, 아세톤을 사용하였으며 mantle heater에서 열을 가해 환류하면서 추출하였다. 추출물은 Whatman(No. 2) 여과지로 여과한 후 회전증발기로 감압 농축한 후 동결건조하여 시료로 사용하였다.

추출물은 추출전 건조 포도씨 분말의 무게에 대해 추출물의 무게 백분율로 계산하였다. 한편 포도씨 유용물질인 총 페놀 함량은 Folin-Denis법에 의해 행하였다. 즉 100 mL 메스플라스크에 75 mL의 증류수와 분획물 1 mL을 넣고 잘 혼합한 후, Folin-Denis 시약 5 mL와 탄산나트륨 포화용액 10 mL를 넣은 후 증류수로 100 mL 용량으로 채웠다. 이것을 잘 혼합하여 실온에서 30분간 방치시킨 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총페놀 함량은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선(Fig. 1)으로 부터 % tannic acid 당량으로 환산하였다(Ra, 1997).

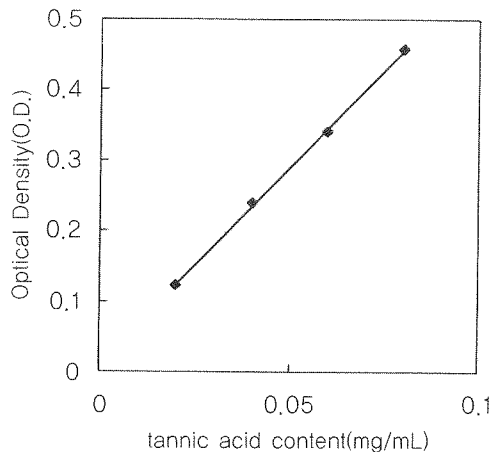


Fig. 1. Standard curve for total phenol content

3. 일반성분의 분석

70% 에탄올로 추출하고 동결건조한 포도씨 추출물 건조분말(GSE, grape seed extract)의 일반성분은 AOAC 방법(1995)에 따라 수분은 상압건조법, 조단백질은 micro-Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet법, 조회분은 건식회화법 및 조섬유는 산알칼리분해법으로 분석하였다.

4. 산가의 측정

G.S.E.와 비교구로서 BHT, TBHQ(tertiarybutyl

hydroxy quinone), ascorbic acid, tannic acid를 미강유와 linoleic acid 각각에 대해서 0.01%(w/v)의 농도가 되도록 첨가하고 60°C에서 30일간 저장한 후 AOAC 방법(1995)에 따라 산가를 측정하였다. 포도씨 추출 건조분말(GSE) 코팅쌀의 지방에 대한 산가도 이와 동일하게 진행하였다.

5. 과산화물가의 측정

Linoleic acid를 기질로 한 과산화물가는 GSE와 비교구로서 BHT, ascorbic acid, α -tocopherol 각각을 linoleic acid에 대해 전체 농도가 0.01%(w/v)가 되도록 에탄올 20mL와 0.2M 인산완충액(pH 7) 25mL를 가해 혼합한 다음 50 mL cap tube에 넣어 60°C에서 30일간 저장하였다. 그 후 이 반응용액을 300 mL 분액여두에 옮긴 다음 소량의 물과 식염 2g을 가하고 chloroform 25mL를 사용해 3회 추출한 다음 하층을 250mL 삼각플라스크에 모으고 초산 25mL와 포화 KI 용액 1mL를 가해 1분간 진탕한 후 암소에 10분간 방치 한 다음 증류수 50mL를 가하고 1% 전분용액을 지시약으로 하여 0.01N 티오황산나트륨(Na₂S₂O₃) 용액으로 적정하여 측정하였다(Lim, 1997). 포도씨 추출 건조분말(GSE) 코팅쌀의 지방에 대한 과산화물가도 이와 동일하게 진행하였다.

Linoleic acid methyl ester에 대한 과산화물가는 100 μ L를 기질로 하여 GSE와 비교구로서 BHT, ascorbic acid, α -tocopherol을 methanol에 0.01%(w/v)로 용해한 용액 50 μ L를 시험관에 넣고 50°C 항온기에 24시간 저장하여 산화를 촉진시킨 다음 chloroform-acetic acid(2:3, v/v) 35mL에 용해시켰다. 이 용액을 공전 삼각 플라스크에 넣고 질소가스로 플라스크내의 공기를 치환시킨 후 포화 KI 수용액 1mL를 첨가하고 1분간 격렬하게 혼합하여 암소에서 5분간 방치시킨 다음 즉시 증류수 75ml와 1% 전분시액 1mL를 첨가 혼합하여 0.01 N 티오황산나트륨 용액으로 I2를 청남색이 무색으로 될 때까지 역적정하여 과산화물가(POV)를 측정하였다. 이때 POV는 다음과 같은 식으로 산출하였다(Yook, 1996).

$$POV(\text{meq/kg}) = \frac{(T_v - B_v) \times 0.01 \times 1000 \times F}{W}$$

T_v : 적정에 소비된 0.01 N Na₂S₂O₃용액의 소비량(mL)

B_v : 사용된 기질(linoleic acid methyl ester)의 적정에 소비된

0.01 N Na₂S₂O₃용액의 소비량(mL)

W : 사용된 linoleic acid methyl ester의 량(g)

F : Na₂S₂O₃용액의 역가

6. Thiobarbituric acid reactive substance(TBARS)와 TBA가 분석

육 등(1996)과 강 등(2001)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)와 ethanol을 4:1로 혼합한 용매에 linoleic acid methyl ester를 10 μ L첨가하여 기질용액을 조제하였다. 기질용액에 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)와 GSE와 비교구인 BHT, ascorbic acid, α -tocopherol 0.01%(w/v) 농도의 각 시료액을 첨가한 후 shaking incubator(60°C)에서 100rpm으로 계속 진탕하면서 경시적으로 TBA(2-thiobarbituric acid)값을 측정하였다. 즉 경시적 반응액에 35% TCA(trichloroacetic acid) 1.0mL, 0.75% TBA 시약 2.0mL를 가한 다음 vortex mixer로 다시 진탕시킨 후 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 그 상등액의 흡광도를 spectrophotometer(8452A Hewlet-Packard, USA)로 532nm에서 측정하여 이를 TBARS 값으로 하였으며, 증류수를 대조군으로 하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Relative antioxidative effect TBARS}(\%) = (A - B) / A \times 100$$

A : 물 첨가군의 흡광도(대조군)

B : 시료첨가군의 흡광도

한편 GSE 코팅쌀의 TBA가는 blender로 갈아 석유에테르로 추출한 유지 3.0g을 삼각플라스크에 정확히 취하고, benzene 10ml를 가하여 유지를 잘 용해한 다

음 0.69g의 2-thiobarbituric acid를 증류수 100ml로 용해하고 빙초산과 1:1로 혼합한TBA 시액 10ml를 가하고 때때로 흔들어 주면서 4분간 방치한 후 이 내용물 전부를 분액깔때기에 옮기고 정치하여 2층으로 분리되면 아래층을 나사뚜껑이 있는 시험관에 모아 마개를 잘 한 다음 끓는물 속에서 30분간 가열하였다. 이것을 흐르는 물에서 냉각한 후 그 용액 일부를 분광광도계의 셀(cell)에 넣고 증류수를 공시험용으로 하여 530nm에서 시료의 흡광도를 3회 측정한 후 그 평균값을 취하고 다음과 같이 계산하였다(채 등, 2000).

$$\text{TBA가} = \frac{(A-B) \times 3 \times 100}{S}$$

- $\left\{ \begin{array}{l} A : \text{본시험의 } 530\text{nm에서의 흡광도} \\ B : \text{공시험의 } 530\text{nm에서의 흡광도} \\ S : \text{시료채취량} \end{array} \right.$

7. 전자공여능(electron donating ability)

Blois의 방법(1958)을 일부 변형하여 측정하였다. 60 μM DPPH 2 mL에 GSE와 비교구인 BHT, ascorbic acid, α -tocopherol 각각 0.01%(w/v) 농도의 용액 2 mL 가하고 5분간 쉬고 30분간 방치후 520 nm에서 측정하였다. 전자공여능은 $100 - [(시료첨가구의 흡광도 / 무첨가구의 흡광도) \times 100]$ 로 나타내었다.

8. LDL에 대한 항산화성

Human LDL(low density lipoprotein)에 대한 항산화성은 400 μg LDL을 0.5mL에 20% TCA 1.5mL를 가한 다음 여기에 0.05M NaOHdp 녹인 0.67% TBA 1.5mL를 넣어 섞은 후 그 최종 반응 혼합액에 GSE가 0.01%가 되도록 첨가하여 90 $^{\circ}\text{C}$ 수욕상에서 45분간 끓였다. 시료를 10분간 원심분리(2,000 \times g)한 다음 상정액을 553nm에서 측정하였다(박등, 1996). TBARS 값은 상기의 relative antioxidative effect TBARS로 평가하였다.

8. 쌀밥 부패균에 대한 항균활성 측정

Broth system에서 포도씨추출물이 쌀밥의 부패미생물인 *Bacillus subtilis* KCCM 11316의 생육에 미치는 억제효과를 측정하기 위해, LB(Lactose Broth)배지에서 농도가 0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1%(w/v) 첨가하여 살균한 후 시험균을 2%(v/v)되게 접종하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 의 항온기에서 48시간 배양하면서 균의 생육을 spectrophotometer (8452A Hewlet-Packard, USA)를 이용하여 620nm에서 흡광도를 측정하였다(Roh 등, 1996).

9. 포도씨추출물의 용해도 특성 연구

쌀에 코팅하기 위한 코팅조성물은 포도씨 추출분말(GSE)을 0.1%의 농도가 되도록 열수, 알콜, 글리세롤, 식용유에 2시간 교반한 후 하루 방치하여 침전물의 형성정도를 여과지(whatman No 1)로 여과하여 여과된 무게를 측정하여 용해도 특성을 비교하였다.

10. 포도씨추출물의 쌀의 최적 코팅조건 결정실험

분말 상태의 포도씨 추출물을 쌀에 코팅하기 위하여 물과 5~80% 알코올과 글리세롤용액에 포도씨 추출물이 10~80%의 농도가 되도록 현탁액을 제조하고 쌀 중량 대비 0.01~1%의 포도씨 추출물의 농도가 되게 회전 코팅 팬(rotary coating pan)에서 air conditioner로 실내온도를 10, 20, 25, 30, 35 $^{\circ}\text{C}$ 로 조절하면서 쌀에 첨가하면서 코팅하여 코팅된 상태를 보고 적합성을 판정하였다.

11. 멥쌀과 코팅쌀의 묵은 쌀 판정실험

60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 40일간 저장한 포도씨 추출물로 코팅한 쌀과 코팅하지 않은 쌀을 각각 20알씩 시험관에 넣고, 1%의 파라페닐렌 디아민(paraphenylene diamine) 용액 한 두 방울을 넣고 잘 혼합하였다. 이후, 쌀을 꺼내어 적갈색(묵은 쌀)과 농적색(헝쌀)의 착색된 정도를 비교하였다(유 등, 1999).

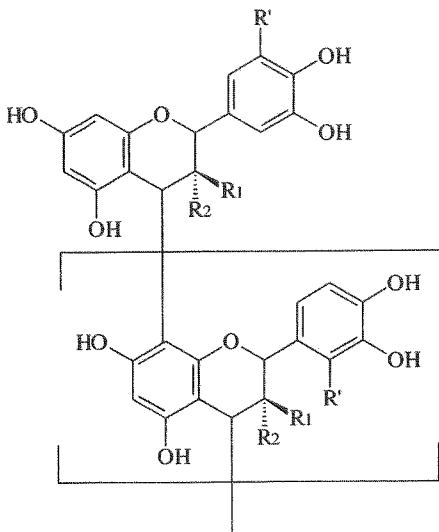
12. 통계분석

실험결과의 평균치 간의 유의성은 SPSS PC+를 이용하여 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 포도씨 유용성분의 구조

포도씨에는 polyhydroxyflavan-3-ol units의 oligomer와 polymer인 proanthocyanidin으로 정의(Jorge 등, 1991)되는 폴리페놀 화합물이 각종 기능성을 나타내는 유용물질로 보고되고 있다(Castillo 등, 2000, 有井雅幸, 1999(I), 1999(II), 2000, 有賀 敏明, 1999). 이러한 폴리페놀화합물의 구조를 보다 간략히 설명하면 녹차의 카테킨류의 구조(Park 등, 1996)를 단량체로 볼 때 이와 유사하거나 동일한 화합물의 polymer로 구성되어 있다고 볼 수 있다(Fig. 2).



- R1 : H or OH
- R2 : H, OH or OG
- R' : H or OH
- OG : G structure

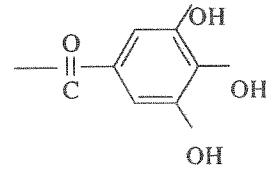


Fig. 2. Structure of proanthocyanidin on the grape seed

1. 용매별 추출물의 추출율 및 폴리페놀 함량

포도씨의 지방을 chloroform으로 추출 제거하고 열을 가한 추출조건에서 열수와 10~99%(v/v)의 농도범위로 에탄올과 아세톤으로 추출하여 동결건조 하였을 때 각 용매조건별로 추출수율과 총페놀함량이 가장 높았던 추출조건만을 선별하여 Table 1에 나타내었다. Table 1의 결과에서 볼 수 있는 바와 같이 동결건조 추출물의 추출수율과 총페놀함량은 70%(v/v) 에탄올을 용매로 하여 추출물을 제조하였을 때가 가장 효율적임을 알 수 있었다.항산화효과에 대한 측면에서 총페놀함량과 항산화효과와는 밀접한 관계(Ra, 1997)가 있기 때문에 추출수율과 폴리페놀 함량이 가장 많은 70% 에탄올 포도씨 추출물(GSE)을 항산화효과 측정 시료로 결정하였다.

2. 포도씨 추출 건조분말(GSE)의 일반성분

70% 에탄올을 용매로 한 포도씨 추출 건조분말(GSE)의 일반성분함량을 Table 2에 나타내었다. GSE는 섬유질의 함량이 높고 단백질과 지방, 회분은 3% 내외를 함유하고 있었다.

3. 포도씨 추출 건조분말(GSE)의 항산화력

가. 산가

일반적으로 쌀겨에 lipase나 lipoxidase가 존재하여 지방의 분해 및 산화에 관여하므로 산가의 급격한 상

Table 1. Extraction yield and total phenol content of grape seed by various solvents.

Fraction	Yield(%)	Total phenol content(%)
Hot water	6.0	14.3
70% aceton	4.0	40.3
70% ethanol	4.3	51.0

Table 2. Proximate composition of GSE

Composition(%)				
Protein	Moisture	Lipid	Ash	Carbohydrate
3.38	2.84	5.50	3.52	29.63

Table 3. Acid values of crude rice bran oil containing GSE and antioxidants of 0.01% after 30 days storage at 60°C.

Acid values						
Control	GSE	BHT	α -tocopherol	ascorbic acid	tannic acid	TBHQ
52.3e	0.5a	2.3a	29.9a	37.7b	38.3c	45.0d

a~eMean values(n=3) with the different letters in a row are significantly different by Duncan's multiple range test(p<0.05)

승이 일어날 것으로 기대되는 정제되지 않은 미강유 (Shin, 1998)를 기질로 하여 GSE와 비교구로 BHT, α -tocopherol, ascorbic acid, tannic acid, TBHQ를 0.01%(w/v)의 동일 농도로 첨가하여 60°C에서 30일 저장 후 산가를 측정할 결과를 Table 3에 나타내었다. 대조구의 산가는 동일한 조건인 60°C에서 30일 저장하였을 때 산가의 변화가 23~24의 범위로 측정되었던 결과(Shin, 1998)보다 다소 높은 결과를 얻었다. Table 3의 결과에서 볼 수 있는 바와 같이 미강유에 대해 GSE 첨가군이 가장 산화에 안정하였으며 BHT, α -tocopherol, ascorbic acid, tannic acid, TBHQ의 순으로 산패 억제효과를 나타내었다.

또한 GSE 0.01%를 첨가하였을 때 동일한 저장조건에서 linoleic를 기질로 하여 측정할 결과를 Fig. 3에 나타내었다. GSE를 첨가하지 않은 linoleic acid는 초기 산가 30에서 저장 30일까지 42로 증가한 반면 GSE 0.01%(w/v)를 첨가한 linoleic acid는 저장 30일까지 초기 산가를 계속 유지하여 산화에 안정함을 확인할 수 있었다.

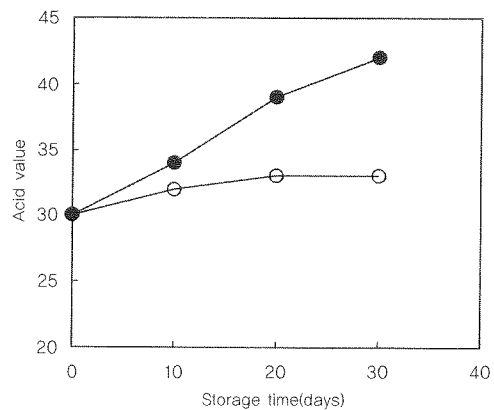


Fig. 3. Changes of the acid value of linoleic acid containing 0.01% GSE(70% ethanol extract) during 30 days storage at 60°C. ○-○ : control, ●-● : linoleic acid emulsion with addition of 0.01% GSE.

나. 과산화물가(POV, peroxide value)

Linoleic acid methyl ester를 기질로 하여 GSE와 비

Table 4. Peroxide value(POV) of crude rice bran oil containing GSE and antioxidants of 0.01% after 30 days storage at 60°C.

Peroxide value(POV, meq/kg)				
Control	GSE	BHT	α -tocopherol	ascorbic acid
1220d	55a	104b	952c	71a

a~dMean values(n=3) with the different letters in a row are significantly different by Duncan's multiple range test(p<0.05)

교구로 BHT, α -tocopherol, ascorbic acid의 동일한 첨가 농도에 대해 유지의 초기 자동산화정도를 나타내는 지표로서 유지의 이중결합정도에 따라 차이를 나타내는 과산화물가(POV)를 측정된 결과를 Table 4에 나타내었다. 과산화물가는 첨가된 항산화제들이 α -tocopherol을 제외하고 대조구에 비해 강한 항산화활성을 나타내었으며 그 중 GSE가 가장 강한 항산화활성을 나타내었다. 사용된 항산화제 중 α -tocopherol의 낮은 항산화효과는 지용성인 비타민이어서 녹이는 용매를 상용적으로 사용되는 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹이지 않고 메탄올로 용해시킨 데 따른 결과에 기인된 것으로 추측된다(Lim 등 1997).

또한 linoleic acid를 기질로 하여60°C에서 30일간 저장하면서 GSE가 0.01%(w/v)첨가된 시료의 POV를

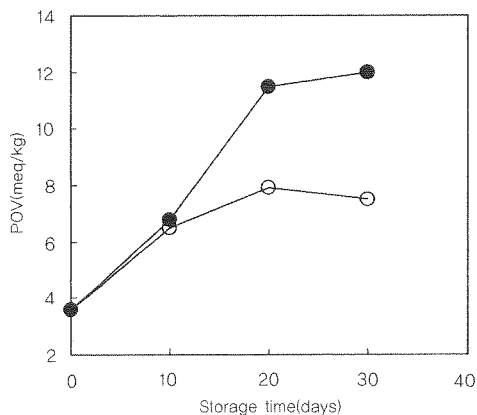


Fig. 4. Changes of the peroxide value of linoleic acid containing 0.01% GSE(70% ethanol extract) during 30 days storage at 60°C. ○-○ : control, ●-● : linoleic acid emulsion with addition of 0.01% GSE.

측정한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. GSE를 첨가하지 않은 시료는 초기 POV 값이 3.8meq/kg에서 저장 20 일 경과 후 POV 11.5meq/kg의 값을 나타내었고 GSE가 첨가된 시료는 저장 20일 경과 후 7.3meq/kg의 POV 값을 나타내어 다소 높은 항산화활성을 보이고 있었다.

다. TBARS

Linoleic acid methyl ester를 기질로 하여 GSE와 비교구로 BHT, α -tocopherol, ascorbic acid를 동일한 농도로 첨가하여 상대적인 항산화효과로 TBARS를 측정된 결과를 Table 5에 나타내었다 산화저해율은 GSE, ascorbic acid, α -tocopherol 및 BHT의 순으로 GSE가 가장 강한 항산화효과를 보임을 알 수 있었다. 항산화활성이 높은 GSE의 유용물질은 폴리페놀이라 할 수 있으며 이러한 페놀성 화합물들은 지방산 산화의 초기 생성물질인 hydroperoxide 및 기타 반응물질과 반응하여 산화를 억제시키는 것으로 보고되어져 있고(Kang 등, 2001, Lim and Shim, 1997) 또한 페놀성 화합물이 radical 생성 촉진 물질인 metal ion(Fe, Cu)과 쉽게 결합하여 macrophage나 free cells 상태에서 free radical의 형성을 감소시킨다고 알려져 있다(Kang 등 2001, Halliwell and Gutteridge, 1990)

라. DPPH에 의한 전자공여능

전자공여작용은 활성라디칼에 전자를 공여하며 유지의 자동산화과정 중 생성되는 라디칼에 전자(또는 수소)를 주는 능력으로 식품 중의 지방질 산화를 억제하는 목적으로 사용되고, 인체내에서는 활성 라디칼에 의한 노화를 억제시키는 작용으로 이용되고 있다. 전자공여능 측정은 DPPH(1,1-Diphenyl-2-picryl

Table 5. Relative antioxidative effect TBARS(%) of GSE and antioxidants.

Relative antioxidative effect TBARS(%)			
GSE	BHT	α -tocopherol	ascorbic acid
53b	37a	37a	52b

a,b,Mean values(n=3) with the different letters in a row are significantly different by Duncan's multiple range test(p<0,05)

Table 6. Electron donating ability of GSE and antioxidants.

Electron donating ability(%)			
GSE	BHT	α -tocopherol	ascorbic acid
95,3a	75,0c	96,3ab	98,2b

a,b,c,Mean values(n=3) with the different letters in a row are significantly different by Duncan's multiple range test(p<0,05)

Table 7. TBARS of GSE and antioxidants for oxidation of LDL

	GSE	BHT	α -tocopherol	Ascorbic acid
TBARS of LDL (%)	90	93	1	85

hydrazil) 라디칼 소거법으로 측정하는 데 DPPH는 분자내 radical을 함유하여 다른 free radical들과 결합하여 안정한 complex를 만들고 있어 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 라디칼이 소거되며 이때의 DPPH의 거동은 hydroxyl radical과 유사하여 프리라디칼 소거실험에 활용된다(Kang 등, 2001). GSE와 비교구로 BHT, α -tocopherol, ascorbic acid를 0,01%(w/v)의 동일 농도로 하여 DPPH 유리라디칼 소거능을 측정한 결과를 Table 6에 나타내었다. 전자공여능은 BHT가 75%를 보였고 GSE, α -tocopherol, ascorbic acid는 95% 이상의 우수한 전자공여능을 나타내었다.

마. Human LDL에 대한 항산화성

동맥경화의 원인인 혈관 내벽에 쌓인 지방층이 산화되면 독성이 강한 유리기인 유리지방산, aldehyde, ketone 등이 생성되어 혈관 내벽을 손상시키고, 지방층 중에서도 저밀도 단백질(low density lipoprotein, LDL)이 산화되어 산화된 LDL이 생성되고 이 산화된 LDL은 단핵세포와 macrophage에 의하여 동맥혈관에 쉽게 이행되며 혈관 내에서 콜레스테롤로 축적되어 foam cells을 형성하여 동맥경화를 일으킨다고

보고되고 있다(박 등, 1996). 이러한 동맥경화의 예방 차원에서 Human LDL에 대한 항산화성을 in vitro에서 TBARS로 측정한 결과를 Table 7에 나타내었다.

GSE와 BHT의 활성이 90과 93%의 TBARS의 높은 산화억제도를 나타내어 LDL 산화로 인해 발생하는 동맥경화에 대한 GSE의 예방효과가 높을 것으로 기대되었다.

4. 포도씨추출물의 용해도 특성 연구

쌀에 코팅하기 위한 코팅조성물 제조에 대비하여 동결건조한 분말상태의 포도씨추출물(GSE)을 쓴맛을 감지할 수 없었던 최대의 첨가가능농도인 0,1%의 농도로 열수, 알콜, 글리세롤, 식용유에 첨가하여 2시간 교반한 후 하루 방치하여 침전물의 건조중량을 측정하여 초기 첨가량 무게에 대한 침전량 비율로 용해도 특성을 비교한 결과를 Table 8에 나타내었다.

열수는 용해시킨 후 하루 방치 후 30%의 침전이 형성되었고, 70% 알콜은 20%, 식용유는 많이 용해되지 않았으며 50% 글리세롤에 녹인 포도씨추출물이 가장 용해안정성이 뛰어난 결과를 얻었다. GSE를 계

Table 8. Solubility of GSE for solvent

	Hot water	70% ethanol	50% glycerol	soybean oil
soluble part(%)	70%	80%	99%	15%
precipitation(%)	30%	20%	1%	85%

조할 때 70% 알콜로 추출하기 때문에 재용해가 쉬울 것으로 예상하였으나 초기 용해 후 하루 경과 시점에서 20%의 침전물이 형성되는 결과를 나타내었다. 그러나 글리세롤은 관능적인 측면에서 다소 영향을 줄 수 있어서 알콜에 녹여 사용하는 것이 바람직 한 것으로 판단되었다.

5. GSE의 항균 활성

쌀밥의 저장성 향상을 위한 포도씨추출물(GSE)의 기능적인 항균 효과를 보기 위하여 쌀밥 부패미생물로 알려진 *Bacillus subtilis* KCCM 11316을 LB(Lactose Broth)배지에서 37°C에서 측정하여 생육에 미치는 억제효과를 측정한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. GSE를 50% 글리세롤에 녹여 0.01%, 0.025%, 0.05%, 0.1%(w/v)의 농도가 되도록 첨가하였기 때문에 글리세롤에 대한 항균효과도 같이 측정하였다. Fig. 5에서 볼 수 있는 바와 같이 글리세롤은 대한 항균효과가 거의 없음을 알 수 있었으며 GSE 무첨가군(control)보다 GSE 첨가군은 0.01%의 농도에서도 최대의 균체량에 도달하는 시간이 16시간에서 48시간으로 생육이 연장되어 쌀밥부패균인 *Bacillus* 균에 대해 생육저해효과가 있음을 알 수 있었다. 노 등(1996)은 녹차물추출물 500, 1000ppm을 첨가하여 쌀밥 미생물인 *Bacillus subtilis* RHJ-I의 생육을 억제시켜 취반시 녹차물추출물 첨가에 의한 쌀밥의 저장성 연장 가능성에 대해 보고한 바 있다.

6. GSE의 쌀에 대한 최적 코팅조건 결정

분말 상태의 GSE를 쌀에 코팅하기 위하여 물과 5~80% 알코올용액에 GSE가 10~80%의 농도가 되도록 현탁액을 제조하고 쌀 중량 대비 GSE가

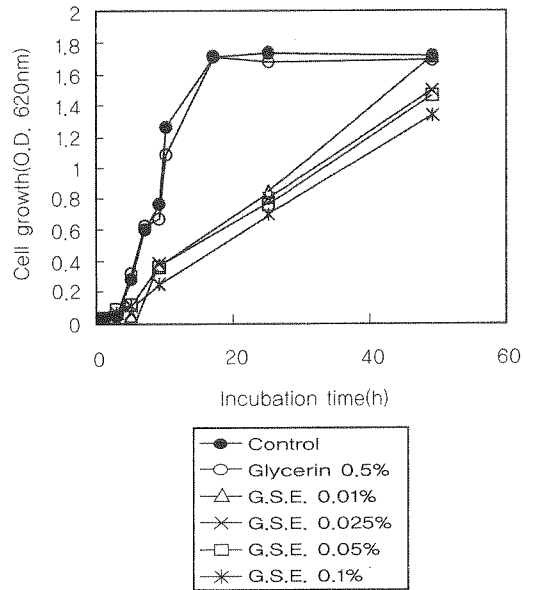


Fig. 5. Inhibitory effect of water G.S.E.(grape seed extract) on the growth of *Bacillus subtilis* KCCM 11316.

0.01~1%의 농도가 되도록 회전 코팅 팬(rotary coating pan)에서 air conditioner로 실내온도를 조절하면서 쌀에 첨가하면서 코팅하였다. 그 결과 코팅제로서 GSE 현탁액은 물과 알코올을 모두 효과적이었다. 특히 물과 알코올 용액 20~60%의 GSE를 현탁하여 코팅하는 것이 가장 상태가 양호 하였으며 온도가 낮은 10°C와 온도가 높은 35°C에서는 25~30°C의 온도에서 코팅하였을 때보다 코팅이 되는 속도가 더디었으며 코팅된 정도를 Folin-Denis법(Ra, 1997)에 의해 총 페놀함량을 역으로 측정 정량한 결과 0.3%의 농도까지 코팅이 가능하였으며 0.2%의 코팅농도까지 폴리페놀 특유의 고미를 감지할 수 없었다(Fig. 6).

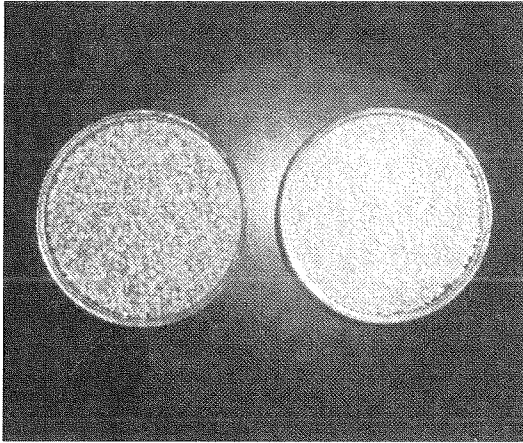


Fig. 6. Comparison of rice coated with G.S.E.(left) and rice(right).

7. GSE 코팅쌀의 항산화성 및 저장성

쌀에서 묵은 쌀과 햅쌀을 비교하는 실험으로는 peroxidase의 활성을 비교해 보면 쌀의 신선도를 측정해볼 수 있는데 이 peroxidase는 쌀의 유지성분의 산패에 관련되는 효소로 쌀이 산패가 진행되면 이 효소의 활성이 낮아진다. 따라서 쌀의 산패억제는 햅쌀로서의 저장성의 연장도 기대할 수 있다. 쌀의 밥맛의 저하원인으로 추정되는 쌀의 기름성분의 산패를 억제시키기 위해 항산화활성이 뛰어난 포도씨 추출물을 쌀의 중량 대비 0.2%로 하여 코팅하고 60°C에

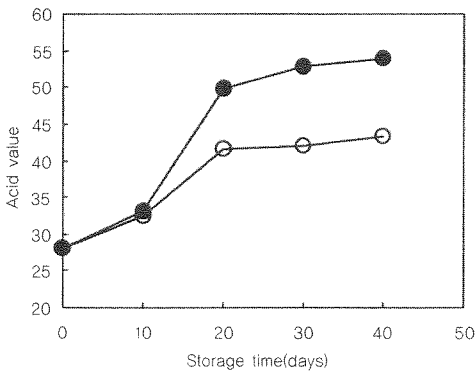


Fig. 7. Acid value of lipid from coated rice and native rice during storage at 60°C.

서 한달 간 저장하면서 GSE 자체의 항산화력이 코팅한 쌀에도 적용되는 지 검증하기 위해 GSE 코팅한 쌀을 60°C에서 저장하면서 석유에테르로 지방을 추출하여 산가, 과산화물가, TBA가를 측정하면서 항산화력을 비교한 결과를 Fig. 7, 8, 9에 나타내었다.

Fig. 7, 8, 9에서 볼 수 있는 바와 같이 자체의 항산화력이 우수한 GSE를 멥쌀에 코팅한 결과 기대했던 대로 GSE 코팅쌀은 항산화력의 산가, 과산화물가(POV), TBA가의 3가지 측면에서 코팅하지 않은 쌀보다 쌀의 지방의 산패를 억제하는 경향을 보였다.

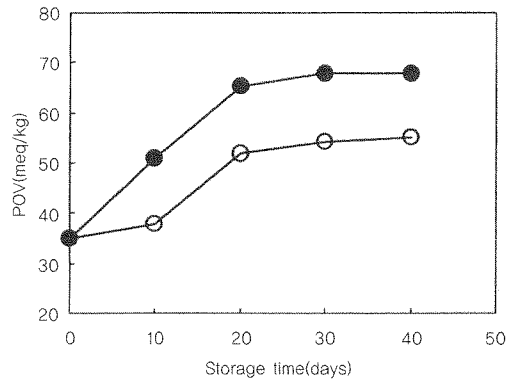


Fig. 8. POV of lipid from coated rice and native rice during storage at 60°C.

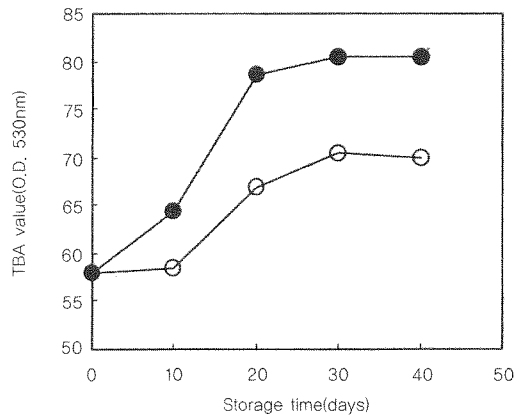


Fig. 9. TBA value of lipid from coated rice and native rice during storage at 60°C.

일반적으로 항산화제의 첨가 시기는 초기 산패의 유도기간에 첨가해야 보다 큰 효과를 얻을 수 있으나 GSE 코팅쌀은 산패시키기 전 초기의 산가, 과산화물가, TBA가의 값이 다소 높은 코팅전의 상태에서도 효과적으로 쌀의 산패억제효과를 나타냄을 볼 수 있었다. 한편 상온(25~35°C)에서 90일간 저장한 GSE 코팅쌀과 코팅하지 않은 쌀을 묶은 쌀과 햅쌀의 판정기준방법(유 등, 1999)에 따라 시약에 착색된 정도를 비교한 결과 햅쌀의 판정기준인 농적색에 가까운 색을 띠어 쌀이 묵지 않아 저장성이 우수함을 알 수 있었다.

IV. 결론

쌀을 고부가가치화 하기 위한 연구의 일환으로 포도가공시에 부산물로 생성되는 포도씨의 유용성분인 폴리페놀의 최적의 추출조건과 이 유용성분의 종합적인 천연항산화기능과 쌀과 쌀밥에 대한 저장성향상효과 및 쌀에 대한 최적의 코팅조건을 연구하였다. 추출조건은 포도씨의 추출전 중량대비 건조수율과 총 페놀함량을 비교한 결과 70% 에탄올로 환류, 가열 추출한 조건이 최적이었으며 이 추출물의 일반성분함량은 51%의 총 페놀함량 이외에 탄수화물이 29.6%로 가장 높게 함유되어 있었고 회분과 단백질 및 조지방이 3% 내외로 함유되어 있었다. 70% 에탄올 포도씨 추출물(GSE)의 항산화기능은 총 4가지의 항목(산가, 과산화물가, TBARS, DPPH)에 대해 기존 항산화제인 BHT, 토코페롤, 비타민 C 등과 비교 조사한 결과 대단히 높은 항산화력을 보였다. 또한 GSE는 쌀밥의 부패균인 고초균(*Bacillus subtilis*)에 대해서도 생육억제 효과를 보임으로써 GSE는 쌀의 지방산패억제 및 부패 억제의 저장기능성을 보유하고 있었다. 또한 기능적인 측면에서도 동맥경화의 원인인 산화된 human LDL(low density lipoprotein)의 형성에 대해 높은 억제 기능을 나타내었다. GSE 현탁액으로 25~30°C의 코팅온도에서 코팅한 GSE 코팅쌀은 GSE 자체의 항산화력에서 기대된 것 처럼 쌀의 지방의 산패에 대해 높은 항산화력을 보였으며 햅쌀 상태로서의 저장 연장성을 보였다. 이러한 결과들로

부터 GSE 코팅쌀은 높은 천연 항산화력에 의해 쌀의 지방의 산패를 억제하고 쌀과 쌀밥의 부패균에 대한 억제효과를 지닌 햅쌀의 저장수명을 연장시키는 저장기능성과 산화된 LDL의 형성억제에 의해 동맥경화 예방효과가 기대되는 기능성효과를 지닌 기능성 코팅쌀이라고 할 수 있으며 이러한 기능성 물질을 쌀에 코팅하여 쌀의 부가가치를 높이고자 하는 많은 연구가 기대된다.

참고 문헌

1. Ames, B. N. and Saul, R. L.(1987), Oxidative DNA damage, cancer and aging, Oxygen and human disease, Ann. Inter. Med. 107: 536-539
2. AOAC(1995), Official Methods of analysis, 16th ed., Association of official analytical chemists, Washington, DC, USA, Vol. 2 chapter 32, p.1-43
3. AOAC(1995), Official Methods of analysis, 16th ed., Association of official analytical chemists, Washington, DC, USA, Vol. 2 chapter 33, p.54
4. Blois, M. S.(1958), Antioxidant determination by the use of a stable free radical, Nature 26: 1199-1200
5. Branen, A. L.(1975), Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, Amer. Oil Chem. Soc. 52: 59-63
6. Castillo, J., Benavente-García O., Lorente, J., Alcaraz, M., Redondo, A., Ortuno, A. and A Del Rio, J.(2000), Antioxidant activity and radioprotective effect against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols(procyanidins) from grape seeds(*Vitis vinifera*): Comparative study versus other phenolic and organic compounds, J. Agric. Food Chem. 48: 1738-1745
7. Chancem, B., Sies, H. and Boveris, A.(1979), Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, Physiol. Rev. 59: 527-605

8. Ames, B. N., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M.(1993), Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging, Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 7915-7922
9. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.(1984), Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, Biochem. J. 219: 1-14
10. Jorge, M. Ricardo, D. S., Jacques, R., Veronique, C., Annie, C. and Michel M.(1991), Procyanidin dimers and trimers from grape seeds, Phytochemistry, 30: 1259-1264
11. Kang, M. H., Park, C. G., Cha, M. S., Seong, N. S., Chung, H. K. and Lee J. B.(2001), Component characteristics of each extract prepared by different extract methods from by-products of Glycyrrhizia uralensis, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 30: 138-142
12. Lee, Y. J. and Han, J. P.(2000), Antioxidative activities and nitrite scavenging abilities of extracts from ulmus devidiana, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29: 893-899
13. Lim K. T. and Shim J. H.(1997), Antioxidative effects of ethanol extracts from Rhus Verniciflua Stokes(RVS) on mouse whole brain cells, Korean J. Food Sci. Technol. 29: 1248-1254
14. Lim, W. Y., Kim, J. S. and Moon, G. S.(1997), Antioxidative effect and characteristics of different model melanoidins with same color intensity, Korean J. Food. Sci. Technol. 29: 1045-1051
15. Park, C. O., Jin, S. H. and Ryu, B. H.(1996), Antioxidant activity of green tea extracts toward human low density lipoprotein, Korean J. Food sci. Technol., 28: 850-858
16. Ra, K. S., Suh, H. J., Chung, S. H. and Son, J. Y.(1997), Antioxidant activity of solvent extract from onion skin, Korean J. Food Sci. Technol. 29: 595-600
17. Shin D. H. and Chung J. K.(1998), Changes during storage of rice germ oil and its fatty acid composition, Korean J. Food Sci. Technol. 30: 77-81
18. Yook, H. S., Kim, S. A., Jo, S. K. and Byun, M. W.(1996), Effect of gamma irradiation on the antioxidative activity and in vitro genotoxicol safety of red ginseng powder, J. Fd. Hyg. Safety 11: 41-50
19. Roh, H. J., Shin Y. S., Lee K. S. and Shin M. K.(1996), Antimicrobial activity of water extract of green tea against cooked putrefactive microorganism, Korean J. Food Sci. Technol. 28: 66-71
20. 유태중, 주현규, 이상건, 한석현, 이기찬(1999), 식품가공실험, 문운당, p42-43
21. 채수규, 강갑석, 마상조, 방광웅, 오문헌(2000), 표준 식품분석학, 지구문화사, p530-531
22. 有井雅幸 (1999), 브ドウ種子 폴리フェノール(プロアントシアニジン) - LDL의 酸化를 抑制, 動脈硬化發病을 抑制する, ビタミン 73: 747-749
23. 有井雅幸(1999), 폴리페놀의 王樣 브ドウ種子 폴리페놀의 主成分 '프로アント시아니진'의 生理作用에 せまる, New Food Industry 41: 43-48
24. 有井雅幸(2000), 메데이칼 허브として 브ドウ種子 폴리페놀-主成分 프로アント시아니진의 生理作用, ジャパンフドサイエンス, 39: 47-51
25. 有賀 敏明(1999), 프로アント시아니진의 抗酸化機能 および 疾病豫防機能と その利用, 日本油化學會誌 48: 1087-1096