

흑마늘 추출액의 첨가 농도에 따른 간장의 품질특성 및 항산화 활성

최명효·강재란·강민정·심혜진·이창권¹·김경민·김동규·신정혜[†]

남해마늘연구소, ¹몽고식품주식회사

Quality Characteristics and Antioxidant Activity of Soy Sauce with Added Levels of Black Garlic Extract

Myoung Hyo Choi · Jae Ran Kang · Min Jung Kang · Hye Jin Sim · Chang Kwon Lee¹ ·

Gyoung Min Kim · Dong Gyu Kim · Jung Hye Shin[†]

Namhae Garlic Research Institute, Gyeongnam 52430, Korea

¹Monggo Foods Co., Ltd., Gyeongnam 51255, Korea

Abstract

Purpose: In order to develop soy sauce and increase its functionality, by adding black garlic extract. **Methods:** We compared quality characteristics and antioxidant activity of 20 days aging black garlic soy sauce from mixed manufacturers with raw soy sauce (commercial fermented soy sauce) and different ratio of black garlic extract (65 Brix, 0.3-5.0%). **Results:** The salt content of the black garlic extract (0.3-5.0%) added soy sauce were 12.35-12.77%. The pH was lowered to 4.99, and acidity was increased to 2.12%, depending on the increase in black garlic extract added ratio. The crude protein and total nitrogen contents were 6.23-6.62% and 1.10-1.16%, respectively, and content of amino form nitrogen was 0.52-0.53%, without significant differences between experimental groups. Contents of reducing sugar and free sugars (fructose and glucose) tended to be higher with higher mixing ratios of black garlic extract. Total phenolic compounds and flavonoids contents were significantly increased in the 3% and 5% black garlic extract addition group. At concentrations of 62.5, 125, 250, 500, 1,000 and 2,000 µg/mL, the DPPH and ABTS radical scavenging activity of the polysaccharides isolated from control soy sauce and 5% black garlic extract added soy sauce showed higher correlation with their concentration. **Conclusion:** These results, confirmed that the soy sauce produced by adding more than 3% of black garlic extract has high antioxidant activity.

Key words: soy sauce, black garlic extract, polysaccharide, DPPH, ABTS

I. 서론

간장을 비롯한 된장 및 고추장 등의 장류는 예로부터 조미를 목적으로 널리 애용되어진 대두 발효 식품으로, 육류 자원이 풍부하지 못한 우리 민족에게 곡류 단백질에서 부족되기 쉬운 필수 아미노산과 필수 지방산 등의 영양성분을 공급해주는 중요한 기능을 가지고 있는 전통 식품이다(Jang DK 등 2003). 아미노산에 의한 구수한 맛, 유리당에 의한 단맛, 유기산에 의한 신맛, 그리고 소금에 의한 짠맛이 어우러져 기본 맛을 내고, 유리아미노산인 glutamic acid에 의한 지미, arginine에 의한 고미, aspartic acid에 의한 감미 등이 혼합되어 맛을 향상시킨다(Choi KS 등 2009).

대두를 발효한 간장은 다양한 맛 성분과 함께 항산화, 항암 효능을 가지는 peptide 및 isoflavone 등과 같은 폴리페놀 화합물, 간 해독작용이 있는 methionine(Kataoka S 2005) 및 콜레스테롤을 용해하여 동맥경화 예방과 고혈압 개선에 도움을 주는 lecithin(Oke M 등 2010)과 같은 기능성 물질들이 함유되어 있어 음식의 조미료뿐만 아니라 기능성 소재로서의 활용 가능성도 보고되고 있다(Moon GS & Cheigh HS 1987, Kim JS 등 2008). 최근에는 간장의 기능성과 관련하여 시판 간장에서 추출한 당류의 항염증 효과(Ko YJ 등 2013), 항균 및 항암활성(Kim KK 등 2007), 장관면역(Lee MS & Shin KS 2014) 등과 관련한 연구가 진행된 바 있다.

이러한 다양한 기능성에도 불구하고, 대표적인 전통 슬

[†]Corresponding author: Jung Hye Shin, Namhae Garlic Research Institute, 2465-8, Namhae-daero, Idong-myeon, Namhae-gun, Gyeongsangnam-do 52430, Korea

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7781-0293>

Tel: +82-55-860-8947, Fax: +82-55-860-8960, E-mail: whanbee@hanmail.net



로우 푸드인 간장의 섭취를 제한하는 이유 중 하나는 제조 시 첨가되는 높은 식염의 함량 때문이다(Kim JA & Cho MS 2009). 식품의약품안전처는 우리나라의 1인 평균 나트륨 섭취량은 4,027 mg으로 WHO 및 우리나라 최대 섭취 권장량의 2배가 넘는다고 발표한 바 있다(Ministry of Food and Drug Safety 2015). 나트륨의 과다 섭취는 고혈압과 같은 심혈관계 질환에 대한 위험을 증가시키는 인자로 지적되고 있어(Shin YJ 등 2014), 장류, 젓갈, 장아찌, 염장 수산물 등 고식염 식품들의 저염화를 위한 노력이 요구되고 있다. 한편으로, 식염이 다량 첨가되는 전통식품들의 경우 식염은 보존성을 높이기 위한 목적으로 활용되고 있어 저염화할 경우 유통기한의 연장과 품질 보존을 위한 방안의 모색이 필요하다(Hong WJ & Kim SM 2013). 저염화에 따른 보존성의 유지를 위해서는 pH의 조정, 보존제의 첨가 또는 보존성과 기능성이 높은 부재료를 첨가하는 방법들이 제안되고 있다. 이 중 기능성이 있는 천연 소재들을 발굴하여 부재료로 활용함으로써 전통식품의 저염화 및 기능성 강화를 모색하는 연구들이 진행되고 있다. 이와 관련하여 생마늘을 첨가한 저염 멸치젓갈(Kwon OC 등 2005), 감초, 겨자 및 키토산을 첨가한 저염 고추장(Lim SI & Song SM 2010), 혈압 저하 기능이 있는 미더덕 껍질, 뿌옇, 양파 추출물을 첨가한 저염 간장(Shin YJ 등 2014) 및 오징어 먹집을 첨가한 저염 오징어 젓갈에 관한 연구(Oh SC 등 2013) 등이 있다. 이처럼 전통 장류식품의 기능성을 강화하기 위한 연구들이 진행되어 있으나 아직까지 흑마늘을 첨가한 간장의 제조 또는 품질특성과 관련한 연구는 수행된 바 없다.

본 연구에서는 생마늘에 비해 폴리페놀 화합물과 S-allyl-L-cysteine(SAC) 함량이 증가하여 항산화력이 강화되고, 동맥경화 개선, 암 예방, 심장질환의 예방, 콜레스테롤 저하 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있는 흑마늘(Canizares P 등 2004, Rahman MS 2007, Yang ST 2007) 추출액의 첨가 농도에 따른 간장의 품질특성 및 항산화 활성을 분석함으로써 기능성이 강화된 흑마늘 간장의 제조를 위한 기초 데이터를 확보하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 에탄올은 Fisher사(Seoul, Korea) 제품을 사용하였고, NaOH, formalin 및 Na₂CO₃은 Daejung chemicals & metals Co., Ltd.(Gyeonggi-do, Korea) 제품을 사용하였으며, 표준물질로 사용된 glucose, fructose, sucrose, gallic acid, quercetin과 Foline-Ciocalteau 시약, aluminum nitrate, potassium acetate, potassium persulfate, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 및 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt

(ABTS)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

2. 시료의 제조

(주)몽고식품의 간장 제조 공정에 따라 제조하여 1차 숙성한 생간장을 이용하여 흑마늘 간장을 제조하였다. 생간장 제조를 위한 개량식 메주는 탈지대두(Samrudhi Nutrients India PVT., Ltd, Mumbai, India)와 볶음 할쇄소맥(Hantop Inc., Busan, Korea)을 동량으로 혼합한 후 *Aspergillus oryzae*(Chungmoo fermentation Co., Ulsan, Korea)를 총량의 0.2% 첨가하여 28°C에서 배양하면서 배양 18시간과 30시간째에 충분히 교반하여 통기를 원활하도록 하여 배양 중 발생하는 열에 의한 국균의 사멸을 최소화하면서 48시간 동안 배양하였다. 완성된 개량식 메주에 23%의 식염수를 가하여 30°C의 발효조에서 4개월 동안 발효·숙성한 후 얻어진 간장 덩을 여과하여 생간장(염도 15%)을 얻었다. 흑마늘 추출액 제조를 위한 흑마늘은 남해보물섬마늘영농조합법인에서 구입하여 사용하였다. 껍질을 제거한 흑마늘에 5배(w/v)의 정제수를 가하여 추출농축기기(COSMOS 660, Kyungseo Machine Co., Incheon, Korea)를 이용하여 95°C에서 5시간 추출한 후 여과한 여액을 70°C에서 진공농축하여 65 brix로 조절하여 사용하였다.

3. 흑마늘 추출액 첨가 간장의 제조

생간장에 정제수를 첨가하여 염도 12%로 조절된 것을 대조군(C-12)으로 하였다. 흑마늘 추출액이 첨가된 간장은 대조군에 65 brix의 흑마늘 추출액을 각각 0.3(E-12-0.3), 0.5(E-12-0.5), 1.0(E-12-1), 3.0(E-12-3) 및 5.0(E-12-5)% 첨가한 다음 대조군과 동일하게 염도를 12%로 조정하여 제조하였다. 각각의 제조된 간장은 900 mL씩 살균된 유리병에 담아 상온에서 20일간 자연 숙성 시킨 다음 시료로 사용하였다.

4. 간장 다당체의 분리

간장 다당체의 분리는 Lee MS & Shin KS(2013)의 방법에 따라 염도 12%의 대조군과 흑마늘이 5% 첨가된 간장 각각 1 L에 에탄올을 가하여 최종 에탄올 농도가 80%가 되도록 조정하였다. 이를 하룻밤 방치한 후, 원심분리기(Combi-514R, Hanil, Seoul, Korea)를 이용하여 3,000 rpm에서 30분간 원심분리 후 침전물을 얻었다. 이 침전물에 소량의 증류수를 가하여 침전물을 재용해하고, 최종 농도가 약 60%가 되도록 에탄올을 가하여 재차 침전물을 회수하였다. 본 침전물은 증류수에 재용해한 다음 dialysis tubing cellulose membrane(MW cut off 12,000, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 2-3일간 투석을 실시하

였다. 분리된 간장 다당체는 동결건조하여 분말화한 후 실험에 사용하였다.

5. 염 농도, pH 및 산도 측정

염도는 시료액 1 mL를 증류수로 10배 희석한 시료를 salt meter(ES-421, Atago Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 3회 이상 측정하였으며, 희석배수를 곱하여 산출하였다.

시료액 5 mL에 증류수를 가해 50 mL로 만들어 pH와 적정산도를 자동적정기(G20 compact titrator, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland)를 이용하여 동시에 측정하였다. 적정산도는 0.1 N NaOH 용액으로 시료액의 pH가 8.4가 될 때까지 적정하여 초산 양으로 환산한 뒤 희석배수를 곱하여 구하였다.

6. 조단백질, 총 질소 및 아미노태 질소의 함량

총 질소 함량은 식품공전(Korea Food and Drug Administration 2015)에 따라 자동 단백질 분석장치(Kjelflex K-360, Buchi Co., Ltd., Oldham, UK)를 이용하여 분석하였으며 질소계수 5.71을 곱하여 조단백질 함량을 계산하였다.

아미노태질소 함량은 Formol 법(Lee KY 등 1997)에 준하여 측정하였다. 즉, 시료 5 g에 증류수 50 mL를 가하고 교반하여 충분히 용해한 다음 20 mL를 취하여 0.1 N NaOH 용액을 가하여 pH 8.4로 조정 후, 20 mL의 중성(pH 8.3) formalin을 가하고 다시 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.4가 되도록 중화 적정하였다. 별도로 증류수에 대한 바탕시험을 실시하여 아미노태 질소 함량을 구하였다.

7. 환원당 측정

환원당의 함량은 dinitrosalicylic acid(DNS)법(Lee KY 등 1997)에 따라 시료 5 g에 증류수를 가하여 50 mL로 정용한 다음 진탕 혼합하고, 이를 10배 희석하여 시료액으로 하였다. 희석액 1 mL와 DNS 시약 3 mL를 혼합하여 100°C의 물에서 5분 동안 중탕한 뒤 증류수를 4 mL 첨가하고 충분히 식힌 후 흡광광도계(Libra S 35, Biochrom, Cambridge, England)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Glucose를 표준물질로 하여 작성한 검량곡선으로부터 환원당 함량(g/100 mL)을 계산하였다.

8. 유리당 함량 분석

각각의 시료를 0.45 µm syringe filter(PVDF 25 mm, Chromdisc, Daegu, Korea)로 여과하여 HPLC(Agilent 1260, Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)로 분석하였다. 분석용 칼럼은 Cosmosil sugar-D(4.6×250 mm, Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan)를 사용하였고, 이동용

매는 water와 acetonitrile을 3:7로 혼합한 용액을 사용하였으며, 컬럼 온도는 30°C를 유지하였다. 이동상의 속도는 1.0 mL/min, 시료 주입량은 10 µL, 검출기는 ELSD(Agilent LT-ELSD G4128A, Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)를 사용하였다. 총 3종의 유리당(fructose, glucose, sucrose) 표준물질을 시료와 동일한 조건에서 분석하여 머무름 시간을 비교해 확인하였으며, 각각의 검량곡선으로부터 그 함량을 산출하였다.

9. 총 페놀 화합물 및 플라보노이드 분석

총 페놀 화합물 함량은 페놀성 물질인 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색을 나타내는 원리를 이용하는 Foil-Denis 방법(Richard Forget FC 등 1992)으로 측정하였다. 각 추출물 1 mL에 Foline-Ciocalteau 시약 0.5 mL를 넣고 3분 후 10% Na₂CO₃ 용액 0.5 mL씩을 가한 후 혼합하여 실온의 암실에서 1시간 정치한 다음 760 nm에서 흡광도를 측정(Biochrom)하였다. 표준물질로 gallic acid를 사용하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 검량선으로부터 총 페놀 화합물의 함량을 계산하였다.

플라보노이드 함량은 추출물 1 mL에 증류수 1 mL, 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL 및 80% ethanol 4.3 mL를 차례로 가한 후 혼합하여 실온의 암실에서 40분간 정치한 다음 415 nm에서 흡광도를 측정(Biochrom)하였다. Quercetin을 표준물질로 하여 얻은 검량선으로부터 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

10. 간장 다당체의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성 측정

DPPH 라디칼 소거활성(Blois MS 1958)은 DPPH에 대한 전자공여 활성으로 나타내었다. 96 well plate에 각 추출물을 62.5, 125, 250, 500, 1,000, 2,000 µg/mL의 농도로 3차 증류수에 희석한 용액 100 µL와 DPPH 용액(4×10⁻⁴ M in ethanol) 100 µL를 넣고 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 효소반응 흡광광도계(VICTOR™X3, PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ABTS 라디칼을 이용한 항산화력 측정은 ABTS cation decolorization 방법(Re R 등 1999)을 수정하여 실시하였다. 7 mM의 ABTS용액과 2.45 mM의 potassium persulfate를 혼합하여 실온의 암소에 12-16시간 보관한 후 415 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록 증류수로 조정하여 ABTS 용액을 제조하였다. ABTS 용액에 동량의 시료액을 혼합하여 실온에서 1분간 반응시킨 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 라디칼 소거활성은 시료 무첨가구에 대한 시료 첨가구의 흡광도비(%)로 계산하였다.

11. 통계처리

분석결과는 통계프로그램인 SPSS Statistics(ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였고, 분산분석(ANOVA)을 실시한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 통계적 유의성을 검증한 후 평균±표준편차로 나타내었다.

III. 결과 및 고찰

1. 간장의 염도, pH 및 산도

짠맛은 네 가지 기본적인 맛 중 첫 번째 맛으로서 음식에서 맛을 결정하는 중요한 요인이며(Song MR & Lee KJ 2008), 소금은 미생물의 생육을 억제하는 역할을 하고 소금의 농도에 따라 숙성진행 속도나 저장성에 영향을 미친다(Moon GS 등 1997).

대조군의 염도는 12.67%였고, 흑마늘 추출액의 첨가 비율을 달리하여 제조한 실험군의 염도는 12.35-12.77%의 범위로 흑마늘 추출물 5% 첨가 시 염도가 유의적인 감소를 나타내었는데(Table 1), Shin JH 등(2010)의 연구 결과에서도 전통간장이 24.87±0.11%인데 반해 마늘간장은 20.97±0.15%로 마늘간장에서 유의적으로 낮아 본 연구 결과와 유사한 경향이였다. 시판 간장의 염도를 확인한 Ko YJ 등(2013)의 연구결과에 따르면 산 분해 간장의 염도는 13.0-16.5%, 양조 간장의 염도는 13.0-14.9%이며, 재래식 국간장의 경우는 21.0-21.8%로 알려져 있다.

흑마늘 추출액의 첨가 비율을 달리한 간장의 pH 및 산도를 측정된 결과(Table 1), 대조군의 pH는 5.16이었는데 흑마늘 추출액의 첨가 비율이 높을수록 더 낮아져 5% 첨가군의 pH는 4.99였고, 산도는 대조군에서 1.87%이던 것이 2.12%로 높아지는 경향을 나타내었다. 흑마늘 추출물을 5% 첨가하였을 때 여타 시료군에 비해 유의적으로 pH는 낮고, 산도는 높았는데, 이는 pH가 3.95±0.02 정도

Table 1. Salt concentration, pH and acidity of soy sauce added with different levels of black garlic extract

Sample code	Salt concentration (%)	pH	Acidity (%)
C-12	12.67±0.06 ^{bc}	5.16±0.08 ^c	1.87±0.09 ^a
E-12-0.3	12.77±0.06 ^c	5.15±0.07 ^c	1.90±0.05 ^a
E-12-0.5	12.73±0.06 ^{bc}	5.13±0.04 ^{bc}	1.93±0.02 ^a
E-12-1	12.65±0.05 ^b	5.11±0.04 ^{bc}	1.98±0.04 ^{ab}
E-12-3	12.67±0.06 ^{bc}	5.04±0.04 ^{ab}	2.07±0.06 ^{bc}
E-12-5	12.35±0.05 ^a	4.99±0.02 ^a	2.12±0.08 ^c

All values are mean±SD (n=3).

^{a-c} Means with different superscripts within the same column are significantly different ($p < 0.05$).

의 강한 산성을 나타내는 흑마늘 추출액 자체의 산성으로 인해(Yang SM 등 2011), 3% 이상 첨가됨으로써 간장의 산도에 영향을 미치기 때문으로 판단된다.

발효식품인 간장의 pH를 분석한 결과 Ko YJ 등(2013)은 4.56-5.08, Kim KR 등(2002)은 4.4-6.6, Sung NJ 등(1988)은 4.4-5.4의 범위로 약산성을 나타낸다고 보고되어 있는데, 이는 본 연구의 결과에서도 유사한 범위였다.

2. 조단백질, 총 질소 및 아미노태 질소 함량

간장의 숙성 과정 중에 미생물과 효소에 의해 원료에 존재하는 질소 성분이 분해되어 유리되면서 총 질소가 증가하는데(Kim JK & Kim CS 1980), 총 질소 성분은 유리아미노산, peptide, 아미노태 질소 등으로 구성되어 있으며(Jeong SJ 등 2014) 용존되어 있는 총 질소는 간장의 숙성도와 밀접한 관계가 있고(Jang DK 등 2003) 총 질소 함량은 유리당 함량의 변화와 유사한 경향을 나타내는 것으로 보고되어 있다(Lee JG 등 2009).

흑마늘 추출액의 첨가 비율을 달리하여 제조한 간장의 조단백질, 총 질소 및 아미노태 질소의 함량을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 흑마늘 추출액이 첨가되지 않은 대조군의 조단백질 및 총 질소 함량은 각각 6.23%와 1.10%였는데, 흑마늘 추출액의 첨가 비율이 높을수록 유의적으로 그 함량이 증가되어 흑마늘 추출액 5% 첨가군의 경우 조단백의 함량은 6.61%였고, 총 질소는 1.16%였다. 아미노태 질소의 경우 0.52-0.53%로 시료간에 유의적인 차이가 없었다. 이러한 결과는 첨가된 흑마늘 추출액 중에 있던 성분이 첨가되면서 영향을 미쳤기 때문으로 생각되는데, 첨가된 65 brix의 고농축 흑마늘 추출액 속에 존재하던 조단백질과 총 질소가 간장과 혼합됨으로써 그 함량이 증가하였으나 상업적 간장의 대량생산 공정에 따라 이미 1차 발효하여 여과된 상태의 생간장과 혼합하여 숙

Table 2. Crude protein, total nitrogen and amino form nitrogen content of soy sauce added with different levels of black garlic extract (%)

Sample code	Crude protein	Total nitrogen	Amino form nitrogen
C-12	6.23±0.02 ^a	1.10±0.00 ^a	0.52±0.01 ^{NS}
E-12-0.3	6.32±0.00 ^{ab}	1.10±0.00 ^a	0.52±0.02
E-12-0.5	6.42±0.00 ^{bc}	1.13±0.00 ^b	0.53±0.01
E-12-1	6.49±0.01 ^{cd}	1.14±0.00 ^{bc}	0.53±0.00
E-12-3	6.62±0.00 ^d	1.16±0.00 ^c	0.53±0.00
E-12-5	6.61±0.19 ^d	1.16±0.03 ^c	0.53±0.01

All values are mean±SD (n=3).

^{a-d} Means with different superscripts within the same column are significantly different ($p < 0.05$).

^{NS} Means not shown the significant difference.

성시켰기 때문에 아미노태 질소의 함량에는 영향을 미치지 못한 것으로 생각된다.

일반적으로 간장의 총 질소 규격은 0.8% 이상(한식간장은 0.7% 이상)으로 규정하고 있으며(Korea Food and Drug Administration 2015), 시판 간장의 경우 총 질소는 0.73-1.42%로 보고되고 있는데(Ko YJ 등 2013), 본 연구 결과 총 질소 함량은 1.10-1.16%, 조단백질 함량은 6.23-6.62%의 범위를 나타내어 간장의 총 질소 규격을 충족하였다.

아미노태 질소는 단백질이 효소작용으로 가수분해되어 맛을 내는 아미노산을 생성하게 되며 아미노태 질소 함량 변화로 유리 아미노산의 변화를 간접적으로 추정할 수 있다(Jeong SJ 등 2014). 아미노태 질소는 원료의 단백질 분해정도, 간장 덧의 숙성도와 구수한 맛을 예측하는 척도(Kim YS 등 1994)로 사용되고 있으며 시판 간장의 아미노태 질소의 함량은 254.98-756.54 mg%로 제품에 따라 현저한 차이를 나타낸다고 보고되어 있다(Ko YJ 등 2013). 본 연구 결과에서 간장의 아미노태 질소 함량은 염도 및 흑마늘 추출액의 첨가에 따른 유의적인 차이가 없어 간장의 염도나 흑마늘 추출액의 첨가가 간장의 풍미에 직접적인 영향을 미치지 않는 것으로 추정된다.

3. 환원당 및 유리당 함량

환원당은 염기성 용액에서 알데하이드 또는 케톤을 형성하는 당의 일종으로 과당, 포도당, 엿당, 글리세르알데하이드 등이 있으며 미생물이 분비한 amylase가 원료 중의 전분질을 분해하여 생성된다(Jeon MS 등 2002). 간장에 함유된 당은 간장에 단맛을 부여하며 발효에 의해 여러 향기 성분과 유기산을 형성한다(Park HK 등 1997).

흑마늘 추출액의 첨가 비율을 달리하여 제조한 간장의 환원당을 측정된 결과(Table 3), 흑마늘 추출액이 첨가되지 않은 대조군의 환원당 함량은 10.67 g/100 mL로 여타 시료군에 비해 유의적으로 낮았고, 흑마늘 추출액의 첨가 비율이 높아질수록 환원당의 함량도 높아져 11.11-13.34 g/100 mL의 범위였다. 이러한 결과는 흑마늘이 고온에서 숙성되는 동안 당이 저분자화 되고 단맛이 증가하여 42.7-54.7 brix 정도의 당도를 가지며, 이를 추출 농축한 흑마늘 추출액이 첨가됨으로 인해 환원당의 함량에 직접적인 영향을 미치기 때문으로 판단된다(You BR 등 2011).

흑마늘 추출액의 첨가 비율을 달리한 간장의 유리당 함량을 분석한 결과(Table 3) fructose와 glucose 2종만이 검출되었는데, 대조군에서는 각각 5.35 g/100 mL와 8.01 g/100 mL 함유되어 있었다. Fructose의 함량은 흑마늘 추출액을 1% 이하로 첨가하였을 때는 5.66-6.03 g/100 mL

Table 3. Reducing and free sugar contents of soy sauce added with different levels of black garlic extract (g/100 mL)

Sample code	Reducing sugar	Free sugar		
		Fructose	Glucose	Total
C-12	10.67±0.15 ^a	5.35±0.93 ^a	8.01±0.79 ^{NS}	13.36±1.72
E-12-0.3	11.11±0.07 ^b	5.66±0.18 ^a	8.41±0.47	14.07±0.65
E-12-0.5	11.26±0.04 ^{bc}	5.99±0.29 ^a	8.17±0.42	14.16±0.71
E-12-1	11.41±0.07 ^c	6.03±0.21 ^{ab}	8.90±0.62	14.93±0.83
E-12-3	12.48±0.12 ^d	7.08±0.63 ^b	8.40±0.12	15.48±0.75
E-12-5	13.34±0.03 ^e	8.03±0.40 ^c	9.09±0.50	17.12±0.90

All values are mean±SD (n=3).

^{a-e} Means with different superscripts within the same column are significantly different ($p<0.05$).

^{NS} Means not shown the significant difference.

로 대조군과 유의적인 차이가 없었으나 3%와 5% 첨가군에서는 각각 7.08 g/100 mL와 8.03 g/100 mL로 대조군에 비해 유의적으로 높은 함량이었다. 하지만 glucose의 함량은 8.17-9.09 g/100 mL의 범위로 흑마늘 추출액의 첨가 비율에 따른 유의적인 차이가 없었다. 흑마늘의 주요 유리당은 fructose와 glucose라는 보고(Choi DJ 등 2008)로 볼 때 흑마늘 추출액의 첨가 농도가 높을수록 fructose의 함량이 증가한 것은 첨가된 흑마늘 추출액의 영향으로 판단된다.

Chung MJ 등(2001)은 고로쇠와 대나무 수액으로 제조한 간장에서는 일반 전통 간장에서 검출되지 않은 fructose와 sucrose가 더 검출되었으며 이는 수액 자체에 존재하는 sucrose, glucose 및 fructose에서 유래한 것이라고 보고한 바 있는데, 이는 본 연구의 결과와 유사한 경향이었다.

4. 총 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량

페놀 화합물은 식물계에 존재하는 천연 항산화제의 대부분을 차지하며, 지방질의 산화, 활성산소의 소거 및 산화적 스트레스를 막는 역할을 하며, 식품 및 의약품 등 다양한 분야에서 활용되고 있다(Park YM & Kim JK 1997).

흑마늘 추출액의 첨가량에 따른 간장의 총 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량을 분석한 결과는 Table 4와 같다. 흑마늘 추출액을 0.3% 첨가하였을 때는 240.33 mg/100 mL로 대조군과 유의적인 차이가 없었으나 그 이상을 첨가하였을 때 총 페놀 화합물의 함량은 유의적으로 증가하였는데 흑마늘 추출액을 3% 및 5% 첨가하였을 때 각각 261.12 mg/100 mL와 283.80 mg/100 mL로 흑마늘 추출액의 첨가량이 많을수록 그 함량도 유의적으로 증가하였다.

총 플라보노이드의 함량도 유사한 경향으로 흑마늘

Table 4. Total phenolic compounds and flavonoid contents of soy sauce added with different levels of black garlic extract (mg/100 mL)

Sample code	Total phenolic compounds	Flavonoid
C-12	236.55±5.15 ^a	29.41±0.47 ^a
E-12-0.3	240.33±5.41 ^{ab}	30.22±0.47 ^a
E-12-0.5	246.00±1.57 ^b	29.95±0.93 ^a
E-12-1	245.48±3.62 ^b	29.41±0.93 ^a
E-12-3	261.12±1.57 ^c	40.43±0.47 ^b
E-12-5	283.80±1.07 ^d	49.84±0.00 ^c

All values are mean±SD (n=3).

^{a-d} Means with different superscripts within the same column are significantly different ($p < 0.05$).

추출액을 1% 이하로 첨가하였을 때는 시료간에 유의적인 차이가 없었으나, 3%와 5% 첨가 시 각각 40.43 mg/100 mL와 49.84 mg/100 mL로 유의적으로 함량이 증가하였다.

Jang YJ 등(2014)은 간장 제조 시 황기 추출액을 5%와 10% 첨가하였을 때 총 페놀 화합물의 함량은 각각 7.6 mg/g과 10.3 mg/g으로 황기의 첨가량이 높을수록 간장 중의 총 페놀 화합물의 함량이 증가한다고 보고한 바 있는데, 이는 본 연구에서도 동일한 경향으로 흑마늘 추출액이 간장의 총 페놀 화합물 함량의 증가에 기여하는 것으로 판단된다.

5. 간장 분리 다당체의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성

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 사용되고 있을 뿐만 아니라 인체 내에서 노화

억제 및 항산화 효과와 관련된 중요한 생리기능을 나타내는 지표이다(Lee JJ 등 2009).

간장 다당체는 숙성 과정에서 완전히 분해되지 않고 간장 내에 일부분만 분해된 형태로 존재하며, 알레르기 억제 효과(Kobayashi M 등 2004), macrophage 및 lymphocyte 기능 증진 효과(Matsushita H 등 2006), 장관 면역 증진 활성(Matsushita H 등 2008) 및 철분 흡수 증진 효과(Kobayashi M 등 2006) 등이 보고되었는데, 본 연구에서는 일반 간장과 흑마늘 추출액을 5% 첨가한 간장 다당체의 항산화 활성을 비교하였다.

간장으로부터 분리한 다당체를 62.5, 125, 250, 500, 1,000 및 2,000 µg/mL 농도로 조절하여 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 Table 5와 같다. 흑마늘이 첨가되지 않은 대조군 간장의 다당체와 흑마늘 추출물이 5% 첨가된 간장 다당체의 DPPH 라디칼 소거활성은 각각 4.75-34.71%와 8.15-52.48%였으며, 농도 의존적으로 활성이 증가하였다.

ABTS 라디칼은 식품 중에 존재하는 항산화 물질과 결합하여 색을 변화시키는 성질이 있는데 이를 이용하여 넓은 pH 범위에서 수용성 및 지용성 항산화 물질이나 단일물 또는 추출물 등의 항산화력 측정에 사용할 수 있다(Re R 등 1999).

간장으로부터 분리한 다당체를 62.5-2,000 µg/mL로 농도를 조절하여 ABTS 라디칼 소거활성을 측정한 결과(Table 6), DPPH 라디칼 소거활성과 동일한 경향으로 시료의 농도가 높을수록 활성도 높아지는 경향이었다. 하지만 DPPH 라디칼 소거활성에 비해 동일 농도에서도 활성은 더 높아 흑마늘 간장 다당체는 1,000 µg/mL 농도에서 100% 이상의 활성을 나타내었고, 흑마늘을 첨가하지 않은 간장 다당체도 88.96%로 활성이 높았다. 이는 양성 대조군으로 사용한 비타민 C를 기준으로 볼 때 동일한 경향이었는데, 이러한 차이는 DPPH와 ABTS간의 라디칼 소거 메커니즘 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

Table 5. DPPH radical scavenging activity of soy sauce added with different levels of black garlic extract

Sample	Concentration (µg/mL)					
	62.5	125	250	500	1000	2000
Soy sauce polysaccharides	4.75±0.08 ^a	5.49±0.19 ^a	7.04±0.41 ^b	9.83±0.76 ^c	19.54±0.84 ^d	34.71±0.11 ^e
Black soy sauce polysaccharides	8.15±0.62 ^{a***}	10.78±0.24 ^{b***}	17.16±1.74 ^{c***}	28.69±0.52 ^{d***}	43.29±1.01 ^{e***}	52.48±1.36 ^{f***}
Positive control concentration	6.25	12.5	25	50	100	
Ascorbic acid	38.07±0.79	74.44±1.22	89.18±0.33	89.87±0.14	90.03±0.07	

Each value represents mean±SD, n=3.

^{a-f} Means with different superscript in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

*** Means with different column in the same superscript are significantly different at $p < 0.001$.

Table 6. ABTS radical scavenging activity of soy sauce added with different levels of black garlic extract (%)

Sample	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)					
	62.5	125	250	500	1000	2000
Soy sauce polysaccharides	9.12 \pm 0.62 ^a	16.38 \pm 0.56 ^b	30.76 \pm 0.59 ^c	57.93 \pm 1.90 ^d	88.96 \pm 0.05 ^e	>100 ^f
Black soy sauce polysaccharides	16.29 \pm 1.13 ^{a***}	27.45 \pm 1.12 ^{b***}	52.01 \pm 1.59 ^{c***}	85.66 \pm 0.70 ^{d***}	>100 ^{e***}	>100 ^{e***}
Positive control concentration	6.25	12.5	25	50	100	
Ascorbic acid	69.85 \pm 1.73	99.91 \pm 0.03	99.84 \pm 0.12	99.96 \pm 0.03	99.98 \pm 0.03	

Each value represents mean \pm SD, n=3.

^{a-f} Means with different superscript in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

^{***} Means with different column in the same superscript are significantly different at $p < 0.001$.

IV. 요약 및 결론

장류의 상업적 대량생산을 위해서는 미생물 발효에 의해 1차 생간장을 생산하고, 이를 여과한 후 첨가 소재와 혼합하여 2차 숙성 시키게 되는데, 본 연구에서는 이러한 공정을 고려하여 기능성 간장의 제조조건을 설정함에 있어 흑마늘 추출액의 첨가비율(65 brix, 0.3-5.0%)을 달리하여 생간장과 혼합한 후 20일간 자연 숙성시켜 흑마늘 간장을 제조하고, 품질특성 및 항산화 활성을 비교 하였다. 실험된 간장의 염도는 12.35-12.77%의 범위였다. pH는 흑마늘 추출액의 첨가 비율이 높아짐에 따라 4.99까지 낮아졌고, 산도는 2.12%까지 높아졌다. 조단백질 및 총 질소 함량은 각각 6.23-6.62%와 1.10-1.16%의 범위로 간장의 품질 규격을 충족하였다. 환원당과 유리당(fructose와 glucose)의 함량은 동일한 경향으로 흑마늘 추출액의 혼합 비율이 높을수록 그 함량도 높았다. 흑마늘 추출액을 1.0% 이하로 첨가하였을 때는 총 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량에 유의차가 없었으나, 3% 및 5% 첨가 시 유의적으로 함량이 증가하였다. 대조군 간장 및 흑마늘 5% 첨가 간장에서 분리한 다당체를 62.5-2,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 조절하여 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 농도 의존적으로 활성이 증가하였다. 간장으로부터 분리한 다당체는 DPPH 라디칼에 비해 ABTS 라디칼 소거활성이 더 높았으며, 흑마늘 추출액이 첨가된 간장의 활성이 더 우수하였다. 이상의 결과들을 종합하여 볼 때 흑마늘 추출액을 3% 첨가함으로써 간장 고유의 품질특성은 유지되면서 감미와 항산화 활성이 더 높은 간장의 제조가 가능함을 확인할 수 있었다.

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgements

This research was supported by Technology Development Program for High Value-added Food Technology Development Program (112066031 HD 020), Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Republic of Korea.

References

- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200.
- Canizares P, Gracia I, Gomez LA, Garcia A, de Argila CM, Boixeda D, de Rafael L. 2004. Thermal degradation of allicin in garlic extracts and its implication on the inhibition of the in-vitro growth of *Helicobacter pylori*. *Biotechnol Prog* 20(1):32-37.
- Choi DJ, Lee SJ, Kang MJ, Cho HS, Sung NJ, Shin JH. 2008. Physicochemical characteristics of black garlic (*Allium sativum* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37(4):465-471.
- Choi KS, Lee HJ, Kwon DJ. 2009. Physicochemical and microbiological properties of Korean traditional *Meju*. *Korean J Food Preserv* 16(2):217-222.
- Chung MJ, Jo JS, Kim HJ, Sung NJ. 2001. The components of the fermented soy sauce from Gorosoe and bamboos sap. *Korean J Food Nutr* 14(2):167-174.
- Hong WJ, Kim SM. 2013. Quality characteristics, shelf-life, and bioactivities of the low salt squid Jeot-gal with natural plant extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42(5):721-729.
- Jang DK, Woo KL, Lee SC. 2003. Quality characteristics of soy sauces containing shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 46(3):220-224.
- Jang YJ, Kim EJ, Choi YH, Choi HS, Song J, Choi JH, Park SY. 2014. Quality characteristics of Korean traditional *Kanjang* containing *Astragalus memvranaceus*. *Korean J Food Preserv* 21(6):885-891.
- Jeon MS, Sohn KH, Chae SH, Park HK, Jeon HJ. 2002. Color characteristics of Korean traditional soy sauces prepared under different processing conditions. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31(1):32-38.

- Jeong SJ, Shin MJ, Jeong SY, Yang HJ, Jeong DY. 2014. Characteristic analysis and production of short-ripened Korean traditional soy sauce added with rice bran. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43(4):550-556.
- Kataoka S. 2005. Functional effects of Japanese style fermented soy sauce and its compounds. *J Biosci Bioeng* 100(3):227-234.
- Kim JA, Cho MS. 2009. Quality changes of immature green cherry tomato pickles with different concentration of soy sauce and soaking temperature during storage. *Korean J Food Culture* 24(3):295-307.
- Kim JK, Kim CS. 1980. The taste components of ordinary Korean soy sauce. *J Korean Agric Chem Soc* 23(2):89-105.
- Kim JS, Kim HO, Moon GS, Lee YS. 2008. Comparison of characteristics between soy sauce and black soy sauce according to the ripening period. *J East Asian Soc Dietary Life* 18(6):981-988.
- Kim KK, Park HC, Son HJ, Kim YG, Lee SM, Choi IS, Choi YW, Shin TS. 2007. Antimicrobial and anticancer activity of Korean traditional soy sauce and paste with Chopi. *J Life Sci* 17(8):1121-1128.
- Kim KR, Lee SJ, Shin JH, Seo JK, Shon MY, Sung NJ. 2002. The formation of N-nitrosamine in soy sauce, soybean paste and beer under simulated gastric digestion. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31(3):378-383.
- Kim YS, Shin DB, Koo MS, Oh HI. 1994. Changes in nitrogen compounds of traditional *Kochujang* during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 26(4):389-392.
- Ko YJ, Lee GR, Ryu CH. 2013. Anti-inflammatory effect of polysaccharide derived from commercial *Kanjang* on mast cells. *J Life Sci* 23(4):569-577.
- Kobayashi M, Matsushita H, Yoshida K, Tsukiyama RI, Sugimura T, Yamamoto K. 2004. In vitro and in vivo anti-allergic activity of soy sauce. *Int J Mol Med* 14(5):879-884.
- Kobayashi M, Nagatani Y, Magishi N, Tokuriki N, Nakata Y, Tsukiyama RI, Imai H, Suzuki M, Saito M, Tsuji K. 2006. Promotive effect of Shoyu polysaccharides from soy sauce on iron absorption in animals and humans. *Int J Mol Med* 18(6):1159-1163.
- Korea Food and Drug Administration. 2015. Food code. Available from: <http://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/safefoodlife/food/foodRvlv/foodRvlv.do>. Accessed December 21, 2015.
- Kwon OC, Shin JH, Sung NJ. 2005. Effect of garlic on lipids of low salted anchovy during fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34(3):420-426.
- Lee JG, Kwon KI, Choung MG, Kwon OJ, Choi JY, Im MH. 2009. Quality analysis on the size and the preparation method of *Meju* for the preparation of Korean traditional soy sauce (*Kanjang*). *J Appl Biol Chem* 52(4):205-211.
- Lee JJ, Kim AR, Chang HC, Lee MY. 2009. Antioxidative effects of *Chungkukjang* preparation by adding solar salt. *Korean J Food Preserv* 16(2):238-245.
- Lee KY, Kim HS, Lee HG, Han O, Chang UJ. 1997. Studies on the prediction of the shelf-life of *Kochujang* through the physicochemical and sensory analysis during storage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26(4):588-594.
- Lee MS, Shin KS. 2013. Macrophage activation by polysaccharides from Korean's commercial and traditional soy sauces. *Korean J Food Nutr* 26(4):797-805.
- Lee MS, Shin KS. 2014. Intestinal immune-modulating activities of polysaccharides isolated from commercial and traditional Korean soy sauces. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43(1):9-15.
- Lim SI, Song SM. 2010. Changes in characteristics of low-salted *Kochujang* with licorice (*Glycyrrhiza glabra*), mustard (*Brassica juncea*), and chitosan during fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39(4):560-566.
- Matsushita H, Kobayashi M, Tsukiyama RI, Fujimoto M, Suzuki M, Tsuji K, Yamamoto K. 2008. Stimulatory effect of Shoyu polysaccharides from soy sauce on the intestinal immune system. *Int J Mol Med* 22(2):243-247.
- Matsushita H, Kobayashi M, Tsukiyama RI, Yamamoto K. 2006. In vitro and in vivo immunomodulating activities of Shoyu polysaccharides from soy sauce. *Int J Mol Med* 17(5):905-909.
- Ministry of Food and Drug Safety. 2015. Status of sodium intake. Available from: http://www.foodnara.go.kr/Na_down/res/contents/natrium2.jsp. Accessed December 21, 2015.
- Moon GS, Cheigh HS. 1987. Antioxidative characteristics of soybean sauce in lipid oxidation process. *Korean J Food Sci Technol* 19(6):537-542.
- Moon GS, Song YS, Lee CG, Kim SK, Ryu BM, Jeon YS. 1997. The study on the salinity of Kimchi and subjective perception of salinity in Pusan area. *Korean J Soc Food Sci* 13(2):179-184.
- Oh SC, Song SI, Jang GH. 2013. The effect of squid ink on the textural properties of squid during low salt fermentation. *J Korean Oil Chemists Soc* 30(3):488-493.
- Oke M, Jacob JK, Paliyath G. 2010. Effect of soy lecithin in enhancing fruit juice/sauce quality. *Food Res Int* 43(1):232-240.
- Park HK, Sohn KH, Park OJ. 1997. Analysis of significant factors in the flavor of traditional Korean soy sauce (I) -Analysis of general characteristics, sugars and organic acids contents-. *Korean J Dietary Culture* 12(1):53-61.
- Park YM, Kim JK. 1997. Characterization of the degradation of pear fruit cell wall by pectolytic enzymes and their use in fruit tissue liquefaction. *J Korean Soc Horti Sci* 38(3):255-262.
- Rahman MS. 2007. Allicin and other functional active components in garlic: Health benefits and bioavailability. *Int J Food Prop* 10(2):245-268.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved

- ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26(9):1231-1237.
- Richard Forget FC, Goupv PM, Nicolas JJ. 1992. Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning. 2. Kinetic studies. *J Agric Food Chem* 40(11):2108-2113.
- Shin JH, Kang MJ, Yang SM, Lee SJ, Ryu JH, Kim RJ, Sung NJ. 2010. Comparison of physicochemical properties and antioxidant activities of Korean traditional *Kanjang* and garlic added *Kanjang*. *J Agric Life Sci* 44(2):39-48.
- Shin YJ, Lee CK, Kim HJ, Kim HS, Seo HG, Lee SC. 2014. Preparation and characteristics of low-salt soy sauce with anti-hypertensive activity by addition of *Miduduk* tunic, mulberry, and onion extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43(6):854-858.
- Song MR, Lee KJ. 2008. Salinity and consumption patterns of Kimchi and soup stew in Jeonju area. *Korean J Food Cook Sci* 24(1):84-91.
- Sung NJ, Hwang OJ, Lee EH. 1988. Studies on N-nitrosamine of Korean ordinary soy sauce. *J Korean Soc Food Nutr* 17(2): 125-135.
- Yang SM, Shin JH, Kang MJ, Sung NJ. 2011. Quality characteristics of pork ham containing different amounts of black garlic extracts. *Korean J Food Preserv* 18(3):349-357.
- Yang ST. 2007. Antioxidative activity of extracts of aged black garlic on oxidation of human low density lipoprotein. *J Life Sci* 17(10):1330-1335.
- You BR, Kim HR, Kim MJ, Kim MR. 2011. Comparison of the quality characteristics and antioxidant activities of the commercial black garlic and lab-prepared fermented and aged black garlic. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40(3):366-371.

Received on Jan.26, 2016/ Revised on Feb.18, 2016/ Accepted on Feb.29, 2016